

LUIZ FERNANDO TONISSI NASSER

**Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento
folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*)**

São Paulo

2006

LUIZ FERNANDO TONISSI NASSER

**Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento
folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Reprodução Animal da Faculdade de Medicina
Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Medicina
Veterinária

Departamento:
Reprodução Animal

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Orientador:
Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli

São Paulo
2006

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Elzer
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
6/1106

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.1628
FMVZ

Nasser, Luiz Fernando Tonissi

Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*) / Luiz Fernando Tonissi Nasser. – São Paulo : L. F. T. Nasser, 2006.
79 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, 2006.

Programa de Pós-graduação: Reprodução Animal.
Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli.

1. Nelore. 2. Onda folicular. 3. Superovulação.
4. Progesterona. 5. Embriões. I. Título.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NASSER, Luiz Fernando Tonissi

Título: Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Medicina Veterinária

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof.Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Julgamento: _____

*À minha esposa, Gisela Dória, pela visão,
incentivo e comprometimento.*

*À minha família, em especial aos meus
pais, Dr. Elias Nasser (in memoriam) e
Milvia, pelo amor e dedicação.*

*Aos meus filhos, Gabriela e Pedro, pela
energia e estímulo para continuar.*

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Pietro Sampaio Baruselli, por me resgatar novamente para a área acadêmica pela amizade, orientação, constante estímulo científico, paciência e confiança.

Ao Prof. Dr. Reuben J. Mapletoft pela amizade, pelo exemplo de dedicação à pesquisa e pela oportunidade que me concedeu de acompanhar as suas atividades no Canadá.

Ao Prof. Dr. Gabriel A. Bo, pelo incentivo, amizade, constante apoio e colaboração nos trabalhos científicos.

Aos meus irmãos José Ítalo e Carlos Eduardo, pelo apoio.

À minha irmã Rosa Helena e família, pela acolhida em sua casa durante o período em que estive em São Paulo.

Aos amigos e sócios Lineu e Lizandra Pasqualloto, que possibilitaram a execução do primeiro trabalho, cedendo as instalações e animais da Fazenda Missões, e pelo apoio durante o programa.

Aos amigos e sócios da Firmasa, Marcelo, Fernando e Alessandra Fuzyi, pelo apoio.

Aos colegas Luiz Fabiano Rezende e José Antonio Menegati, pela colaboração durante o programa e pelo apoio nos trabalhos científicos.

Aos colegas Carlos Ronaldo Rezende, Michele Pereira, Marcelo Nunes e Carlos Wisnesck, pela amizade e pela colaboração durante os projetos.

Aos amigos Elton Zeferino e Nestor Nogueira Jr, pela confiança e por cederem os animais para os Experimentos 2 e 3.

Ao colega Everton L. Reis, pela colaboração durante a execução dos experimentos, e pela ajuda durante o programa em São Paulo.

Ao Frigorífico Independência, por ceder as instalações da Fazenda e possibilitar a utilização desta para a realização de parte do experimento.

Ao amigo e futuro colega Teo Figueiredo pela ajuda, colaboração e comprometimento durante o programa em São Paulo.

A André Dayan, Yeda e Michele Watanabe, sócios da Vitrogen, em especial à equipe de Campo Grande, Patrícia Stranieri, Aliúcha Fonseca e Yone Castro, pelo envolvimento e dedicação no Experimento 2.

A Nélcio Carvalho e Manoel Sá Filho, do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, pela amizade, pela colaboração nos projetos e pela realização da análise estatística.

Aos laboratórios Tecnopec e Bioniche (Canadá), pela doação dos fármacos para a realização dos experimentos.

Ao Jair Assis, pela doação do sêmen do touro utilizado no Experimento 3.

Aos amigos e produtores rurais Luiz Brito, Carlos Jurgielewicz e Antonio Salgueiro, pelo incentivo e confiança.

À Érica Cristiane G. Fellipe - e ao Laboratório de Dosagens Hormonais do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo -, pela execução das dosagens de progesterona.

A Harumi Shiraishi e Thaís Soto, secretárias de Pós-Graduação do Departamento de Reprodução Animal, pela amizade e esclarecimentos.

À Marieta Trancoso de Castro, pela formatação e revisão deste trabalho.

Ao Departamento de Reprodução Animal, seus professores, funcionários, alunos de pós-graduação e estagiários, pelo convívio e ensinamentos.

À Família Birnbaum Figueiredo, Martine e Ana, pela amizade e apoio em São Paulo.

A Artur Barros e Laís Dória, pelo incentivo e pelo apoio aos netos.

A todos os demais parentes e amigos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste projeto.

“Quando uma espécie é introduzida em um novo ambiente, ou ela se adapta e se reproduz ou degenera e morre”.

(Jan Bosma)

RESUMO

NASSER, L. F. T. **Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*)**. [Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors]. 2006. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Três experimentos foram realizados para testar a hipótese de que a resposta superestimulatória de doadoras Nelore (*Bos indicus*) com tratamentos iniciados próximo à ovulação durante a primeira onda de crescimento folicular seria maior ou comparável àquela decorrente de tratamentos convencionais. Os animais foram aleatoriamente alocados em três grupos. As doadoras dos Grupos 1 - Onda 1 s/P4 e 2 - Onda 1 c/P4 foram superestimuladas na primeira onda de crescimento folicular, e as do Grupo 3 - SincBE+P4/P4 quatro dias após a sincronização da emergência folicular com estradiol e progesterona. Os animais receberam dispositivo intravaginal de Progesterona (CIDR) associado a 50mg de Progesterona e 2,5mg de Benzoato de Estradiol (IM) no Dia 0. Os animais dos Grupos 1 e 2 receberam PGF2 α no Dia 5 e 12,5mg Armour de LH (Lutropin) 24 horas após a remoção do CIDR (Dia 9), e no Dia 11 iniciou-se o tratamento superovulatório. As doadoras do Grupo 2 receberam um novo CIDR juntamente com a primeira dose de FSH (Dia 11). Todos os animais foram superestimulados com 133mg NIH-FSH-P1 de Folltropin diluídos em 10ml, em duas aplicações diárias de 1ml, por cinco dias. No último dia de tratamento, junto com o FSH foram aplicadas doses luteolíticas de PGF2 α ; nos Grupos 2 e 3 o CIDR foi removido na última aplicação. Todas as doadoras receberam 25mg de LH 24 horas após a última dose de FSH e foram inseminadas 12 e 24 horas após o LH. Os embriões foram coletados e avaliados pelo mesmo veterinário sete dias após a inseminação. No primeiro experimento, as quantidades de embriões transferíveis

não foi significativamente diferente entre os grupos 2 e 3 ($8,0 \pm 1,8$ x $6,6 \pm 2,0$), e ambas foram maiores que as do 1 ($0,2 \pm 0,2$; $P < 0,05$). Como não houve diferença entre os Grupos 2 e 3 nos parâmetros analisados, o Grupo 3 foi excluído dos outros dois experimentos. No segundo experimento, as doadoras receberam os mesmos tratamentos dos Grupos 1 e 2, mas foram abatidas 12 horas após receberem 25mg de LH (Dia 16) e tiveram seus ovários removidos e levados para o laboratório, para classificação. Os oócitos foram aspirados e avaliados quanto à maturação pela expansão do COC. Os animais que não receberam dispositivo de P4 durante o tratamento superovulatório apresentaram maior número de oócitos não maturados ($6,4 \pm 2,7$ x $1,2 \pm 0,9$; $P < 0,05$). O terceiro experimento foi semelhante ao segundo, com a diferença de que os animais foram inseminados 12 horas após o tratamento com 25mg de LH, e tiveram as estruturas coletadas 7 dias após a IA. Os resultados desse experimento confirmaram os do primeiro, no qual animais sem suplementação exógena de P4 durante o tratamento superovulatório apresentaram menor número de embriões transferíveis que o grupo com P4 ($0,0 \pm 0,0$ x $3,9 \pm 1,1$; $P < 0,05$). Os resultados obtidos retificam a hipótese, demonstrando que a superovulação durante a primeira onda de crescimento folicular em novilhas Nelore é eficiente somente com suplementação exógena de P4.

Palavras-chaves: Nelore. Onda Folicular. Superovulação. Progesterona. Embriões.

ABSTRACT

NASSER, L. F. T. **Superovulatory response during the first follicular wave in Nelore (*Bos indicus*) donors.** [Resposta superovulatória na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*)]. 2006. 79 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Three experiments were design to test the hypothesis that superovulatory (SPO) response of Nelore (*Bos indicus*) donors to treatments administered during the first follicular wave, initiated at the expected time of ovulation, will elicited a higher or a comparable response to traditional protocols. In the first experiment, cows were randomly allocated into 1 of 3 treatment groups. Cows in Group Wave 1 without P4 e Group Wave 1 with P4 were superstimulated during the first follicular wave and cows in the Control Group were superstimulated after synchronized follicular wave emergence using estradiol and progesterone. All cows received a CIDR device and an injection of 50mg of P4 and 2.5mg EB on Day 0. Cows in Groups Wave 1 with P4 and Wave 1 without P4 were also treated with PGF2 α on Day 5 and 12,5mg Armour of pLH (Lutropin) 24 h after CIDR removal (Day 9), to synchronize ovulation. The SPO treatments were initiated on Day 11; donor cows in Group Wave 1 with P4 also received a new CIDR device at the time of the first FSH injection. All donors in three groups were superstimulated with a total dose of 133mg NIH-FSH-P1 of Folltropin-V, divided into twice daily injections of the same dosage (13,3mg diluted in 1ml) over 5 days. On the last day of FSH treatment, all animals received PGF2 α after each FSH injection and cows in Group Wave 1 with P4 and Control Group had their CIDR removed at the time of the last FSH injection. All cows received 25 mg of pLH 24h after the last FSH treatment and were AI 12 and 24h later. Ova/embryo collection and evaluation was done 7d after, all by the same veterinarian. Results indicate that there was no difference in the numbers of transferable embryos in CIDR treated donor cows

when SPO treatments were initiated at the time of emergence of either the first follicular wave Group Wave 1 with P4 (8.0 ± 1.8) or following synchronization of follicular wave emergence with BE + P4, control Group (6.6 ± 2.0), but both were greater than when SPO treatments were initiated at the first follicular wave without the use of a CIDR device, Wave 1 without P4 (0.2 ± 0.2 ; $P < 0.05$). Since there were no differences between Groups Wave 1 with P4 and control on all the end points, this group was dropped from the others experiments. A second experiment was performed in order to evaluate the quality of oocyte recovered after animals were treated under the same protocol of Groups Wave 1. The SPO treatments were the same described previously, however 12h after the injection of 25mg of pLH animals were slaughtered and their ovaries were taken to an IVF lab. Follicles were aspirated and the oocyte was evaluated and those with an expanded COC were considered mature. Animals in Group Wave 1 without P4 showed a greater ($P < 0.05$) number of immature oocyte (6.4 ± 2.7) than Group Wave 1 with P4 (1.2 ± 0.9). The third experiment was performed to confirm the results of the first experiment. The treatments were similar as the second experiment, however, animals were AI 12 and 24h after the 25mg of pLH and had ova/embryos collection and evaluation 7 d after by the same veterinarian. Results of this experiment confirmed the first experiment presenting a greater ($P < 0.05$) number of transferable embryos in Group Wave 1 with P4 (3.9 ± 1.1) when compared to Group Wave 1 without P4 (0.0 ± 0.0). The results did not support the hypothesis, showing that exogenous P4 is necessary in order to superovulate Nelore during the first follicular wave.

Key words: Nelore. Follicular Wave. Superovulation. Progesterone. Embryos.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados no experimento 1 44
- Figura 2 - Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados no experimento 2 46
- Figura 3 - Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados no experimento 3 49

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore com ou sem suplementação exógena de progesterona. Campo Grande, 2004 56
- Gráfico 2 - Concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular nos grupos do Experimento 3 (onda1s/P4) e (onda1c/P4). Campo Grande, 2004 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número de folículos no dia da IATF, número de CL no dia da colheita, taxa de ovulação, taxa de recuperação, quantidade e qualidade das estruturas embrionárias recuperadas, conforme grupo experimental. Dourados, 2002	54
Tabela 2 -	Taxa de ovulação no início da SPO, número de folículos no dia do LH, taxa de luteólise, quantidade de folículos grandes no dia da segunda aplicação de LH, total de oócitos recuperados (maturados, não maturados e atrésicos) de doadoras Nelore superovuladas na primeira onda de crescimento folicular com ou sem suplementação exógena de progesterona. Campo Grande, 2004	55
Tabela 3 -	Resposta ao tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (<i>Bos indicus</i>) com ou sem suplementação exógena de progesterona. Campo Grande, 2004	58

LISTA DE ABREVIATURAS E DE SIGLAS

%	porcentagem
° C	grau Célcus
BE	benzoato de estradiol
BST	somatotrofina bovina
CIDR	dispositivo intravaginal de progesterona
CL	corpo lúteo
COC	<i>cumulus oocyte complexes</i>
D + 1	um dia depois da ovulação
D + 2	dois dias depois da ovulação
D 0	dia da ovulação
D -1	um dia antes da ovulação
D	dia
E-17 β	estradiol 17 β -estradiol
E ₂	estradiol
eCG	gonadotrofina coriônica eqüina
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FD	folículo dominante
FIV	fecundação <i>in vitro</i>
FMVZ/USP	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo
FSH	hormônio folículo estimulante
g	grama
GnRH	hormônio liberador das gonadotrofinas
H 0	hipótese de nulidade
IA	inseminação artificial
IATF	inseminação artificial em tempo fixo
IGF -1	fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1
IGF	fator de crescimento semelhante à insulina
IM	intramuscular
LDH	laboratório de dosagens hormonais
LH	hormônio luteinizante

Log ₁₀ x	logaritmo na base 10
m	manhã
mg	miligrama
MHz	megaHertz
ml	mililitro
mm	milímetro
MOET	múltipla ovulação e transferência de embrião
MS	Mato Grosso do Sul
ng/ml	nanogramas por ml
NPAR1WAY	análise de variância não paramétrica
Onda 1 c/P4	grupo onda 1 com suplementação com progesterona
Onda 1 s/P4	grupo onda 1 sem suplementação com progesterona
P	nível de significância
P ₄	progesterona
PBS	solução tampão fosfato-salina
PGF	prostaglandina
PGF _{2α}	prostaglandina dois alfa
RIE	radioimunoensaio
RQ x	raiz quadrada
SAS	sistema de análise estatística
SincBE+P4/P4	grupo com onda folicular sincronizada com BE e P4 e suplementada com progesterona
SMB	Syncro-Mate B
SP	São Paulo
SPO	superovulação
t	tarde
TE	transferência de embriões
UI	unidade(s) internacional(is)
US	ultra-som
VE	valerato de estradiol
x ²	Quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS	23
2.2	FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM <i>Bos taurus</i> E <i>Bos indicus</i>	26
2.3	SUPEROVULAÇÃO DE BOVINOS	28
2.4	MANIPULAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR	30
2.4.1	<i>Priming</i> Folicular	30
2.4.2	Aspiração Folicular	31
2.4.3	Tratamento com Progestágeno/Progesterona associado ao Estradiol	33
2.4.4	Superovulação na primeira onda de crescimento folicular	37
3	HIPÓTESE DO TRABALHO	39
4	OBJETIVOS	40
5	MATERIAL E MÉTODOS	41
5.1	EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS SUPEROVULATÓRIAS DA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E DA ONDA SINCRONIZADA COM BENZOATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>).....	41
5.1.1	Animais e Local do Experimento	41
5.1.2	Tratamentos	42
5.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS OÓCITOS APÓS A SUPERESTIMULAÇÃO NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>)	45
5.2.1	Animais e Local do Experimento	45
5.2.2	Tratamentos	45
5.2.3	Aspiração e classificação dos oócitos.....	47
5.3	EXPERIMENTO 3: RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>)	47
5.3.1	Animais e Local do Experimento	47
5.3.2	Tratamentos	48
5.4	COLHEITA DOS EMBRIÕES	50
5.5	EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS	50
5.6	COLHEITA DE SANGUE E DOSAGENS DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA	51
5.7.1	ANÁLISE ESTATÍSTICA	52
6	RESULTADOS	53
6.1	EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS SUPEROVULATÓRIAS DA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E DA ONDA SINCRONIZADA COM BENZOATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>)	53

6.2	EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS OÓCITOS APÓS A SUPERESTIMULAÇÃO NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>)	55
6.2	EXPERIMENTO 3: RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (<i>BOS INDICUS</i>)	57
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69

1 INTRODUÇÃO

De acordo com informações publicadas pela *Food and Agriculture Organization* (FAO, 2004), foram identificadas cerca de 1.400.000 espécies de plantas e animais. Mas, embora esse universo de vida e sua variabilidade genética sejam essenciais para a existência humana, 1.350 das 6.300 espécies de animais domésticos registradas ao redor do mundo estão ameaçadas de extinção ou já estão extintas.

Esse quadro, aliado ao crescimento das populações humanas - que promove o aumento da demanda por proteínas de origem animal -, fez com que a utilização de programas e sistemas voltados à preservação da diversidade genética das espécies nativas, ou daquelas já adaptadas ao meio ambiente local, ganhasse ímpeto nas últimas décadas do século XX. Mas, a despeito dos bons resultados obtidos nos países industrializados, nem sempre esses programas proporcionam o mesmo retorno quando aplicados em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos.

O Brasil, de tamanho continental e de grande vocação agropecuária, vem se destacando como uma grande potência mundial para a produção de alimentos. O rebanho bovino brasileiro é composto por aproximadamente 171 milhões de cabeças, das quais 136 milhões pertencem a raças de corte e 35 milhões a raças leiteiras. As raças *Bos indicus*, principalmente a Nelore e seus cruzamentos, representam aproximadamente 109 milhões de cabeças (80%) do rebanho nacional, constituindo-se no maior rebanho de corte comercial do mundo. Com a conquista de novos mercados, o Brasil passou a liderar as exportações de carne, atingindo a

marca recorde de mais de dois milhões de toneladas de carne exportadas em 2005 (CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL, 2005).

Com números tão expressivos e produzindo em regiões de clima tropical, essa genética bovina adaptada e produtiva passou a ser exportada - em forma de sêmen, embriões e animais vivos - para países cujo sistema de produção se assemelha àquele existente no Brasil. Entretanto, para a manutenção e o aumento desse mercado é necessário padronizar o produto a ser exportado, o que só será possível com o melhoramento genético do rebanho nacional. Daí a importância da seleção e da multiplicação de animais superiores, que pode ser realizada com o auxílio de diferentes biotécnicas.

Dentre tais biotécnicas destaca-se a transferência de embriões (TE), que vem sendo largamente utilizada por grande número de países (BO et al., 2002). De acordo com Land e Hill (1975), o emprego de múltipla ovulação e transferência de embriões (MOET) aumenta em quase duas vezes a taxa de ganho genético obtida com as estratégias de cruzamento tradicional em um rebanho.

No ano de 2004 foram transferidos ao redor do mundo cerca de 480.000 embriões bovinos produzidos por MOET, e cerca de 106.000 embriões produzidos por fecundação *in vitro* (THIBIER, 2004). Nesse cenário, o Brasil se insere como vice-líder mundial em número de transferências de embriões produzidos *in vivo* - 87.732 TE -, e líder mundial de embriões produzidos *in vitro* - 60.000 TE (THIBIER, 2004).

Embora empregada comercialmente por mais de trinta anos, a variabilidade da resposta superovulatória continua sendo um fator limitante para a transferência de embriões bovinos. Assim é que, a despeito do incontestável avanço no conhecimento das variáveis envolvidas no processo de TE, a média de embriões por

colheita, apontada por Looney em 1986 como em torno de 6,2, muito pouco evoluiu nos últimos anos.

A variabilidade da resposta ovariana já foi relacionada às diferenças nos tratamentos superovulatórios, tais como: tipos de gonadotrofinas (MAPLETOFT; PIERSON, 1993), dosagem das gonadotrofinas (GONZALEZ et al., 1990; PAWLYSHYN et al., 1986), local e forma de aplicação das gonadotrofinas (BO et al., 1994b), duração dos tratamentos superestimulatórios (GARCIA; SEIDEL; ELSDEN, 1982) e adição de outros hormônios no protocolo (SAVAGE; HOWELL; MAPLETOFT; 1987). Como fatores inerentes à fisiologia da doadora, encontram-se variações como a idade (LERNER et al., 1986), a época do ano (TRIBULO et al., 1991), a raça (CHUPIN; COMBARNOUS; PROCOREUR, 1985), o estado nutricional (ORTUÑO; CARSON, 1985) e o histórico reprodutivo (HASLER et al., 1983) do animal.

Além das variações acima citadas, a hora do início da superovulação (SPO) em relação ao momento do ciclo estral é um dos fatores que mais altera a resposta superovulatória (CHUPIN; COMBARNOUS; PROCOREUR, 1985; LINDSELL; MURPHY; MAPLETOFT, 1986). Aproximadamente 70% da variabilidade na resposta ovulatória está relacionada ao status ovariano na hora do início do tratamento (MONNIAUX; CHUPIN; SAUMANDE, 1983). Já foi demonstrado que, quando se inicia o tratamento na presença de um folículo dominante (GRASSO et al., 1989; GUILBAULT et al., 1991; PIERSON; GINTHER, 1988) ou depois da sua seleção (ADAMS et al., 1994; NASSER, et al., 1993), a resposta superovulatória diminui significativamente. A melhor resposta é alcançada quando os tratamentos são empregados no início do desenvolvimento de uma onda de crescimento folicular

(NASSER et al., 1993) e na presença de um grande número de pequenos folículos (ROMERO et al., 1991).

A manipulação da dinâmica folicular com o objetivo de sincronizar o início de uma nova onda tem sido utilizada como ferramenta para a obtenção do momento ideal para iniciar os tratamentos superovulatórios. A destruição do folículo dominante por aspiração via ultra-sonografia induz uma nova onda folicular em média dois dias após a aspiração (BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS; 1994). Embora eficaz na sincronização, essa técnica tem apresentado resultados conflitantes no que diz respeito ao seu potencial econômico (BERGFELT et al., 1997). Outra forma de sincronização, atualmente a mais utilizada, é a aplicação de hormônios esteróides, conhecidos por alterar o crescimento folicular e que, pelas combinações, possibilitam a sincronização de uma nova onda de crescimento folicular (BO et al., 1993, 1996a; BO; PIERSON; MAPLETOFT, 1991).

Além disso, sabe-se que é possível iniciar os tratamentos no início da primeira onda de crescimento folicular - que ocorre fisiologicamente logo após a ovulação (NASSER et al., 1993) -, sem diminuir ou prejudicar a resposta superovulatória (ADAMS et al., 1994).

A grande maioria dos estudos anteriormente comentados foi conduzida em animais *Bos taurus*, e as diferenças fisiológicas existentes entre os animais *Bos indicus* e *Bos taurus* impedem a transposição automática de algumas técnicas de uma para outra raça sem investigações prévias quanto à sua funcionalidade.

Assim, a confirmação da viabilidade de protocolos alternativos de superovulação em doadoras Nelore (*Bos indicus*) é de suma importância para o incremento dessa genética animal, agregando valores à pecuária nacional.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CICLO ESTRAL E DINÂMICA FOLICULAR EM BOVINOS

A duração do ciclo estral dos bovinos varia entre 17 e 25 dias, com semelhanças entre as fêmeas zebuínas e taurinas (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995; SIROIS; FORTUNE, 1988; VACA et al., 1985). Nesse intervalo, o desenvolvimento folicular se apresenta como uma seqüência dinâmica de eventos fisiológicos e endocrinológicos que envolvem o crescimento e a atresia dos folículos antrais, em movimentos que se assemelham a ondas (PIERSON; GHINTER, 1984).

Essa teoria das ondas foliculares foi sendo proposta por Rajakoski (1960), que realizou estudos histológicos em ovários obtidos em matadouros. Com base nas observações realizadas, o autor sugeriu a existência de duas ondas de desenvolvimento de folículos antrais durante o ciclo estral, cada uma delas apresentando um folículo que crescia até o diâmetro pré-ovulatório.

Com o advento da ultra-sonografia, técnica de avaliação não invasiva e em tempo real, outros estudiosos comprovaram a teoria de que o crescimento dos folículos se dava em forma de ondas, e verificaram que cada ciclo tinha de duas até quatro ondas de crescimento folicular (PIERSON; GINTHER, 1988; SÁVIO et al., 1988; SIROIS; FORTUNE, 1988). Com esse tipo de exame, foi possível analisar a dinâmica folicular mediante a correlação temporal entre os eventos endocrinológicos

e o aparecimento das estruturas ovarianas no decorrer do ciclo estral (ADAMS et al., 1992a, 1992b; GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989a; SIROIS; FORTUNE, 1988).

A primeira onda de crescimento folicular é inicialmente identificada no dia da ovulação (Dia 0), e reconhecida ultra-sonograficamente pela visualização de um grupo de folículos antrais (3 a 5mm) responsivos às gonadotrofinas. Essa etapa, denominada fase de recrutamento, está associada à elevação das concentrações plasmáticas do hormônio folículo estimulante - FSH (ADAMS et al., 1992b). A concentração de FSH atinge seu pico máximo quando o maior folículo, denominado folículo dominante (FD), atinge o tamanho de 4-5mm (GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989b). No início dessa fase, o crescimento do FD e de todos os demais folículos - identificados como subordinados – ocorre graças ao FSH circulante (ADAMS et al., 1992b). A partir desse momento, o FD cresce de forma linear - fase de crescimento - por seis dias, e as concentrações periféricas de estrógenos e andrógenos aumentam (SUNDERLAND et al., 1994).

Ao redor do Dia 3, e com um diâmetro de aproximadamente 8,5mm, o FD adquire receptores para o hormônio luteinizante (LH) nas células da granulosa - momento denominado desvio - e passa então a exercer a sua dominância (GARVERICK; ZOLLERS; SMITH, 1992). Mesmo com níveis basais de FSH, o FD atinge o seu platô após o desvio graças ao efeito positivo do LH, e tem seu crescimento limitado pela progesterona (P4) secretada pelo corpo lúteo – CL (RAJAMAHENDRAN; MANIKKAN, 1994), que promove a diminuição da frequência e aumenta a amplitude dos pulsos de LH (BERGFELT et al., 1995). O aumento de receptores para o LH capacita o folículo a responder à alta amplitude dos pulsos desse hormônio e continuar a crescer.

Ao atingir o platô, o FD entra na fase denominada estática, na qual exerce sua dominância sobre os folículos subordinados - causando a atresia destes - por mais seis dias (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b). Após o período de dominância, e sem a secreção contínua dos andrógenos produzida pelo FD, ocorre um novo pico de FSH. Esse pico é responsável pelo início de uma nova onda de crescimento folicular, que faz com que o folículo dominante da primeira onda entre em atresia (ADAMS et al., 1992b). Esse mecanismo pode ocorrer duas, três ou quatro vezes em um mesmo intervalo entre ciclos estrais (GINTEHR; KASTELIC; KNOPF, 1989a), e é descrito para animais *Bos indicus* (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO; 1995).

Os elementos envolvidos no mecanismo que rege a dominância folicular ainda não estão completamente elucidados. De acordo com Fortune (1993), por um mecanismo de retroalimentação negativa no eixo hipotalâmico-hipofisário, a presença de altas concentrações de estradiol e inibina produzidas pelo FD provoca a diminuição das concentrações plasmáticas de FSH a níveis basais, bloqueando o crescimento dos folículos FSH-dependentes e acarretando a sua atresia.

Em estudo recente, Fortune, Rivera e Yang (2004) demonstraram a importância do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) no mecanismo de dominância. Durante o desenvolvimento folicular, parte das ações do IGF-I está envolvida na estimulação da célula da granulosa, na proliferação da teca e na esteroidogênese (SPICER; ALPIZAR; ECHETERNKAMP, 1993), responsáveis pela biodisponibilidade de receptores para FSH. Essa biodisponibilidade de receptores para o FSH já está presente em maior quantidade no folículo dominante tão logo este é identificado morfológicamente como FD, o que demonstra a sua atuação de

dominância concomitantemente à emergência da onda folicular (FORTUNE; RIVERA; YANG, 2004).

O processo de crescimento e de atresia dos folículos perdura enquanto o corpo lúteo se mantiver funcional e produzindo progesterona, o que ocorre mesmo durante a gestação (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b). Quando não há o reconhecimento materno da gestação, determinado principalmente pelo conceito - através da produção de interferon trofoblástico - e sinalizado para as células do endométrio, ocorre o processo de luteólise (THATCHER et al., 2001). O momento da regressão do corpo lúteo determina se o FD será o folículo ovulatório (GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989b). O crescimento do FD promove o aumento das concentrações de estrógenos, que desencadeia o mecanismo de retroalimentação positiva para a secreção do hormônio liberador das gonadotrofinas (GnRH) e o conseqüente pico de LH, promovendo a ovulação (FORTUNE, 1993).

2.2 FISIOLOGIA REPRODUTIVA EM *Bos taurus* E *Bos indicus*

Estudos indicam que características como o número de ondas por ciclo, o crescimento folicular e a dominância são similares para as fêmeas *Bos taurus* e *Bos indicus* (BARROS; FIGUEIREDO; PINHEIRO, 1995; BO et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997; GAMBINI et al., 1998; GINTHER; KASTELIC; KNOPF, 1989a; SIROIS; FORTUNE, 1988).

Apesar da semelhança no padrão de crescimento folicular, diferenças morfológicas e endócrinas foram reportadas (RANDEL, 1989). Animais *Bos indicus*

apresentam diâmetros máximos do FD (10-12mm) e do CL (17-21mm - BO et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997) menores do que aqueles característicos de animais *Bos taurus*, cujos diâmetros são: FD - 14-20mm - CL - 20-30mm (BO et al., 1993; FIGUEIREDO et al., 1997; GINTHER; KASTELIC; KNOFF, 1989b). A diferença de tamanho do CL tem uma implicação prática para os animais, uma vez que dificulta a sua identificação via palpação retal. Já foi descrito que a quantidade de progesterona presente no CL de animais *Bos indicus* é menor do que aquela observada em animais *Bos taurus*, o que sugere a diminuição dos níveis circulantes de progesterona para os últimos (SERGERSON et al., 1984). Randel (1989) levantou a hipótese de que o menor tamanho do CL nos animais *Bos indicus* seria resultante de menor resposta ao estrógeno, menor pico pré-ovulatório de LH, e diferenças endocrinológicas relacionadas aos eventos que culminam com a ovulação.

Com referência à população folicular, os ovários dos animais *Bos indicus* apresentam maior quantidade de folículos menores que 5mm emergindo no início da onda folicular do que os animais *Bos taurus* (SERGERSON et al., 1984).

Outra diferença existente entre as duas subespécies está relacionada às concentrações de insulina ovariana e ao fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I). Em estudo realizado em novilha Nelore, Buratini Jr. et al. (2000) observaram que o tratamento com somatotrofina bovina (BST) aumentou as concentrações de IGF-I no plasma e o número de pequenos folículos (<5mm), à semelhança do que relatam similarmente relatados com animais *Bos taurus* (GONG; BRAMLEY; WEBB, 1991). Entretanto, a taxa de crescimento da população folicular foi menor do que aquela de animais *Bos taurus*, sugerindo que o sistema IGF ovariano pode diferir entre as duas subespécies.

De acordo com Alvarez et al. (2000) e Simpson et al. (1994), vacas Brahman apresentam maior concentração plasmática de IGF-I e menor concentração de FSH do que vacas Angus. Assim, a maior quantidade de folículos encontrada em vacas Brahman poderia ser decorrente da alta concentração de IGF-I. O elevado nível de IGF-I, associado à baixa concentração de FSH, pode resultar na formação de um FD menos persistente, o que implica maior quantidade de ondas foliculares entre os ciclos estrais (ALVAREZ et al., 2000). A diferença entre os sistemas IGF-I e FSH também poderia explicar porque os animais *Bos indicus* são mais sensíveis às dosagens de FSH - hormônio normalmente utilizado nos programas de superovulação - do que os animais *Bos taurus* (BARROS; NOGUEIRA, 2001).

2.3 SUPEROVULAÇÃO DE BOVINOS

O objetivo dos tratamentos superovulatórios realizados em fêmeas doadoras é obter o maior número possível de embriões transferíveis que apresentem grande probabilidade de produzir prenhez. Para tanto, um grande número de folículos deve ser resgatado antes de entrar em atresia, atingindo assim o tamanho pré-ovulatório.

Os métodos tradicionais de superovulações implicam a aplicação exógena de hormônios gonadotróficos. A gonadotrofina coriônica eqüina (eCG) e os extratos crus ou purificados de pituitária, como o FSH contaminado ou não com o LH, são os mais rotineiramente utilizados (ELSDEN; NELSON; SEIDEL 1978).

Monniaux, Chupin e Saumande (1983) identificaram duas classes de vacas doadoras que respondiam pobremente ou não respondiam aos tratamentos com

gonadotrofinas exógenas. O primeiro grupo tinha de 50-200 folículos em crescimento por ovário, enquanto as vacas que responderam bem tinham 600 ou mais folículos nos ovários. A resposta pobre dos animais do primeiro grupo poderia ser decorrente da baixa população folicular, insuficiente para apresentar resposta adequada. Conseqüentemente, seria difícil obter melhoria na resposta nesse grupo de animais. O segundo grupo de doadoras apresentava grande número de folículos no início do tratamento, mas estes já estavam fisiologicamente entrando em atresia. Esse grupo de animais poderia apresentar melhor resposta caso o tratamento com FSH tivesse sido implementado no início da onda folicular.

Originalmente, considerava-se que o momento ideal para o início tratamento superovulatório com gonadotrofinas seria aquele em que os folículos estivessem maturando e com alta concentração de estrógeno, o que durante o ciclo estral ocorreria entre os dias 7 e 13 depois do cio (cio=dia 0; IRELAND; ROCHE, 1982).

Lindsell, Murphy e Mapletoft (1986) obtiveram melhor resposta superovulatória em tratamentos iniciados no dia 9 do ciclo do que em tratamentos iniciados nos dias 3, 6 ou 12.

Guilbault et al. (1991) verificaram que a resposta superovulatória decrescia de 40% a 50% quando os tratamentos eram iniciados na presença de um folículo dominante. Alta correlação entre o número de folículos pequenos (3-6mm) no início do tratamento superestimulatório e a resposta superovulatória foi constatada por Romero et al. (1991) e Van Der Schans et al. (1991). A interpretação conjunta dos dados sugere que a resposta a tratamentos superestimulatórios iniciados quando o FD já está exercendo a sua dominância é baixa, e que a melhor resposta superovulatória ocorre quando os tratamentos são iniciados na presença de um *pool* de pequenos folículos em crescimento. Assim, o momento ideal de dar início a esse

tipo de tratamento seria o início de uma nova onda de crescimento folicular (GUILBAUT et al., 1991; NASSER et al., 1993).

2.4 MANIPULAÇÃO DA DINÂMICA FOLICULAR

2.4.1 *Priming* Folicular

O *priming* foi concebido para mimetizar o pico endógeno de FSH que ocorre antes do início de cada onda folicular através da aplicação de gonadotrofinas, promovendo o aumento do número de folículos recrutados que emerge em uma nova onda subsequente ao tratamento (ADAMS, 1994). Rajamahendran et al. (1987) e Touati et al. (1991) demonstraram efeito benéfico dos pré-tratamentos com gonadotrofinas sobre as respostas superovulatórias, mas outros autores, como Rieger, Desaulinier e Goff (1988) não obtiveram o mesmo resultado. Já Grasso et al. (1989) e Guilbault et al. (1991) constataram que os pré-tratamentos surtem efeito adverso sobre a superovulação. Esse efeito adverso poderia estar relacionado ao momento de início dos tratamentos, pois aqueles iniciados após o segundo dia do ciclo podem estimular o desenvolvimento do FD, levando os folículos subordinados à atresia.

Murphy et al. (1984) observaram que gonadotrofinas oriundas do extrato cru de pituitárias apresentavam uma variação contaminada com LH em sua constituição. Esse produto contaminado com LH, quando empregado para o *priming*, poderia promover a luteinização do FD e não a estimulação dos demais folículos. Já quando

foi utilizado FSH altamente purificado de extrato de pituitária verificou-se melhora na resposta superovulatória, o que demonstra o efeito benéfico do FSH em estimular pequenos folículos antrais a serem mais responsivos às gonadotrofinas em tratamentos subsequentes (TOUATI et al., 1991).

Entretanto, a eficiência do *priming* em protocolos de superovulação ainda suscita dúvidas, pois os estudos voltados ao assunto não apresentaram regularidade, quer com relação às datas dos pré-tratamentos, quer com relação à bioatividade das gonadotrofinas administradas.

2.4.2 Aspiração Folicular

De acordo com Adams et al. (1992b), no dia posterior à remoção do FD por eletrocauterização inicia-se um pico de FSH, responsável pela emergência de uma nova onda de crescimento folicular cerca de dois dias após a cauterização.

Outra maneira de eliminar o FD – que na atualidade é rotineiramente utilizada para programas de aspiração folicular e fecundação *in vitro* – é a aspiração por punção ovariana guiada por ultra-sonografia (BERGFELT; LIGHTFOOT; ADAMS, 1994). Na tentativa de aproveitar esse método de sincronização de onda folicular para programas de superovulação, Bergfelt et al. (1997) compararam dois grupos de novilhas superovuladas: no primeiro grupo, a superovulação foi iniciada um dia após a aspiração e a remoção do FD; no segundo grupo – controle -, os tratamentos com FSH tiveram início nos dias 8, 9, 10, 11 e 12 após a observação do cio. A média da quantidade de embriões e/ou estruturas coletadas, bem como o

número e a porcentagem de embriões viáveis não diferiram entre os grupos. Embora não tenha ocorrido diferença significativa entre os grupos, os autores identificaram uma deficiência no desenho experimental do grupo aspirado, que inadequadamente poderia controlar a fase luteínica, causando ovulações pré-maturas e regressão incompleta do CL. Para contornar tal situação foi realizado um segundo experimento, no qual os animais do grupo testado receberam um implante auricular de progestágeno contendo 6mg de norgestomet (Syncro-Mate-B) após a aspiração. Novamente não houve diferença significativa na resposta superovulatória entre os grupos, mas o grupo aspiração + progestágeno apresentou resposta mais consistente em relação ao número de embriões viáveis e transferíveis, confirmando que o controle do CL é necessário (BERGFELT et al., 1997).

Em outro estudo, animais submetidos à aspiração do FD dois dias antes do início da superovulação – realizada durante o diestro - tiveram maior resposta superovulatória do que aqueles em que a SPO foi iniciada em presença de um FD (BUNGARTS; NIEMAN, 1994).

Para avaliar a eficácia da utilização do GnRH em protocolos de SPO, Khoram et al. (1995) compararam animais que receberam GnRH dois dias antes da superovulação, fêmeas superovuladas após a aplicação do GnRH e a aspiração do FD, e animais superestimulados tradicionalmente nos dias 8 a 12 após o cio. Os resultados permitiram que os autores concluíssem que o tratamento com GnRH associado à aspiração do FD só não foi melhor que a SPO tradicional porque os animais do primeiro grupo apresentaram grande número de estruturas não fertilizadas e degeneradas. Analisados conjuntamente, os achados da investigação indicam a necessidade de controlar a fase luteínica para a obtenção de estruturas

viáveis, e a dificuldade de utilização desse procedimento em programas comerciais de larga escala.

2.4.3 Tratamento com Progestágeno/Progesterona associado ao Estradiol

Atualmente, estão disponíveis no mercado vários produtos à base de progestágeno ou progesterona associados ao estradiol para protocolos de sincronização da dinâmica folicular e do estro. A finalidade desses produtos é a reposição do CL natural por um artificial, para prevenir o cio e a ovulação. Inicialmente, a associação entre progestágeno/progesterona e estradiol tinha como objetivo induzir o útero a liberar prostaglandina (PGF) e, conseqüentemente, causar a luteólise (WILTBANK; KASSON, 1968). Entretanto, após a descoberta de sua capacidade luteolítica em ruminantes, a prostaglandina e seus análogos tornaram-se os agentes luteolíticos de eleição, pois promovem melhores respostas do que aquelas obtidas com o estradiol (LEMON, 1975).

Bo, Pierson e Mapletoft (1991) e Bo et al. (1993, 1994a, 1995a) realizaram uma série de experimentos voltados à avaliação do efeito do estradiol e dos progestágeno sobre a dinâmica folicular. Os resultados demonstraram que o estradiol exógeno inibe o crescimento do FD, efeito que é mais acentuado quando se utiliza a combinação progestágeno + estradiol. O FD de novilhas tratadas com 5mg de estradiol 17 beta (E-17 β) um dia depois da inserção do implante de progestágeno parou de crescer, entrando em atresia, no dia subsequente à aplicação do E-17 β . Esse evento acarretou a emergência de uma nova onda de crescimento folicular 4,3 + 0,2 dias depois da aplicação do medicamento (BO et al.,

1995a). No entanto, quando o estradiol 17β foi aplicado em novilhas sem o progestágeno, não foi observada supressão do FD e, conseqüentemente, a emergência da nova onda folicular ficou imprevisível (BO et al., 1996a).

O efeito de outros ésteres de estradiol associados a implantes de P4/progestágeno - com composições químicas e meias-vidas diferentes - sobre o desenvolvimento da onda folicular também tem sido investigado. Em novilhas de corte, o valerato de estradiol (VE) em uma dose de 5mg resulta em menor previsibilidade na emergência da onda (BO et al., 1993). Entretanto, a administração de uma dose de 2mg de benzoato de estradiol (BE) em combinação com 50mg de P4 via intramuscular (IM) resulta na emergência de uma nova onda folicular em 4,0 + 0,2 dia, com variação de 4 a 5 dias (CACCIA; BO, 1998).

Algumas investigações tiveram como objetivo utilizar a emergência da onda folicular artificialmente manipulada em protocolos de superovulação. Meyer et al. (2000) verificaram que doadoras que receberam implante de progestágeno no dia da ovulação (dia 0) e no dia 1 foram tratadas com 5mg de E- 17β para sincronização da emergência da onda quatro dias antes do início do FSH apresentaram resposta superestimulatória semelhante àquela de doadoras tratadas com o protocolo de superovulação tradicional iniciado entre os dias 8 e 12 após o cio.

Utilizando doadoras em estágios aleatórios do ciclo estral, Bo et al. (1996a) empregaram o esquema de sincronização de onda e de superovulação descrito por Meyer et al. (2000), e também não constataram diferença significativa em relação à SPO tradicional. A análise conjunta dos dados mostrou que o implante de progestágeno, associado à aplicação de 5mg de 17β estradiol + 50mg de P4, pode sincronizar nova onda de folículos responsivos à gonadotrofina em protocolos de

superovulação, da mesma forma que os folículos que crescem fisiologicamente no início da segunda onda folicular tradicionalmente utilizados o fazem.

O uso do valerato de estradiol como agente luteolítico, e posteriormente para a manipulação da dinâmica folicular, deu origem a dois tipos de produtos comerciais: o Sincro-Mate-B (SMB®; Merial) - que contém 6mg de norgestomed (WILT BANK et al., 1971) - e o Crestar (Interve®) - que contém 3mg de norgestomed. Embora as doses de norgestomed e a composição química desses produtos sejam distintas, a sua liberação na circulação é similar. Ambos vêm acompanhados de uma injeção IM de 5mg de valerato de estradiol e 3mg de norgestomed, que deve ser administrada no momento da inserção do implante auricular.

De acordo com Mapletoft e Pierson (1993, 1994), animais superovulados sete dias após o tratamento com SMB e VE apresentam resultados comparáveis àqueles em que se utiliza o CL do meio do ciclo. Já Bo, Pierson e Mapletoft (1991) obtiveram melhor resposta em tratamentos iniciados cinco dias após a aplicação do SMB. Assim, sugerem que o hiato de sete dias entre o tratamento com SMB e a SPO é muito grande, e que a melhor resposta que obtiveram deveu-se a terem iniciado o tratamento com FSH na emergência da nova onda folicular, induzida pelo VE e pelo implante de progestágeno.

Graças à disponibilidade comercial e à eficiência na sincronização do início da onda, o benzoato de estradiol é bastante utilizado nos protocolos de sincronização para programas de MOET. A aplicação de 2,5mg de BE e 50mg de P4 no momento da inserção do dispositivo de progesterona *Controlled Internal Drug Release-B* (CIDR-B) induziu a emergência de uma nova onda de crescimento folicular sincronizada três a quatro dias após o tratamento (CACCIA; BO, 1998). A superovulação iniciada quatro dias após o tratamento com 2,5mg de BE e 50mg de

P4 apresentou respostas semelhantes às aquelas obtidas em SPO iniciadas quatro dias após o tratamento com 5mg (CACCIA; BO, 1998) ou com 2,5 mg (CACCIA; TRIBULO; TRIBULO, 2002) de 17β estradiol associados a 50mg de P4, ou às aquelas decorrente de SPO iniciadas 8 a 12 dias após o estro (MEYER et al., 2000).

Macmillan et al. (1991) desenvolveram o sistema chamado *Controlled Internal Drug Release* (CIDR), que consiste em um dispositivo intravaginal contendo 1,9g de P4 e uma cápsula de gelatina contendo 10mg de BE inserida junto com o dispositivo intravaginal. Segundo os autores, a quantidade de P4 liberada pelo dispositivo é altamente predizível, com valores médios das concentrações de P4 no plasma em torno de 5-6ng/ml e conteúdo médio residual de 0,92g.

Avaliando o efeito da retroalimentação interativa da P4 e do BE sobre a secreção de gonadotrofinas, Macmillan e Burke (1996) constataram que a inclusão intravaginal do BE potencializa o efeito da P4 na supressão do LH. A utilização do BE via intramuscular demonstrou ser mais eficaz e eficiente na sincronização da emergência da onda folicular (BO et al., 1995b). Protocolos com dispositivos intravaginais de progesterona com aplicações IM de BE, associados aos indutores de ovulação como o GnRH e o LH, passaram a fazer parte dos programas de superovulação, principalmente no Brasil, pois permitem a adequação dos programas ao tempo do técnico, independentemente da fisiologia da doadora (BARROS; NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2003).

2.4.4 Superovulação na Primeira Onda de Crescimento Folicular

Nasser et al. (1993) demonstraram que é possível obter resposta superovulatória estimulando os folículos na primeira onda de crescimento folicular. Para tanto, os tratamentos com FSH devem ser iniciados próximo ao momento de pico endógeno desse hormônio, caracterizado pelo recrutamento dos folículos emergentes na onda. Os autores elegeram a primeira onda, e não as subseqüentes, porque o dia da ovulação (D 0) pode ser utilizado como ponto de referência da emergência da primeira onda, que se inicia logo após a ovulação. Os tratamentos foram iniciados no dia -1 (D -1 = um dia antes da ovulação), no dia 0 (D 0 = dia da ovulação), no dia + 1 (D +1 = um dia após a ovulação) e no dia +2 (D +2 = dois dias após a ovulação), respectivamente. Considerando que o CL seria responsivo à prostaglandina no dia 5 após o cio (MOMONT; SEGUIN, 1984) - ou seja, aproximadamente quatro dias após a ovulação -, algumas modificações no protocolo de SPO foram feitas, para ajustá-lo à fisiologia ovariana. O protocolo de FSH passou de 4 para 5 dias, e a dose de prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) foi dobrada e aplicada no último dia da SPO, de modo a que o recém-formado CL tivesse tempo de responder ao tratamento. O número de folículos ≥ 7 mm no último dia de FSH foi maior nos grupos de tratamentos iniciados nos D -1 e D0 ($22,0 \pm 3,4$, $20,3 \pm 3,8$) – antes da seleção do FD – do que nos grupos cujos tratamentos foram iniciados nos D +1 e D + 2 ($7,7 \pm 2,4$, $7,3 \pm 2,3$). A análise desses resultados demonstra o efeito benéfico dos tratamentos iniciados próximo ao pico endógeno de FSH, que fornece suporte para que os folículos subordinados cresçam e atinjam um tamanho pré-ovulatório. Também a capacidade que o FD tem de diminuir a resposta superestimulatória é

demonstrada: este já exercia a sua dominância sobre os subordinados um dia após o início da onda, antes mesmo de ser caracterizado e visualizado ao exame ultrasonográfico (NASSER et al., 1993).

Para comparar a resposta superovulatória dos folículos da primeira onda e dos folículos da segunda onda em novilhas *Bos taurus*, Adams et al. (1994) utilizaram o mesmo protocolo de SPO descrito por Nasser et al. (1993) em ambos os tratamentos. As novilhas do grupo Onda 1 foram superovuladas no dia da ovulação (D 0), e as do grupo Onda 2 no início da segunda onda – momento determinado por exame ultra-sonográfico -, com os tratamentos iniciados aproximadamente ao redor do dia 9 do ciclo. Os dois grupos apresentaram resultados semelhantes: a taxa de recuperação ($5,2 \pm 0,7$, $5,1 \pm 0,8$) e a qualidade dos embriões derivados dos folículos da primeira onda foram equivalentes àquelas dos embriões derivados da onda subsequente. Os autores observam que, independentemente da onda folicular utilizada, para que um número maior de folículos cresça até o tamanho pré-ovulatório, os tratamentos de SPO devem ser iniciados no momento da emergência, antes da manifestação do FD. E concluem, afirmando que é possível utilizar o momento da ovulação como marco preciso de referência para o início da SPO em protocolos iniciados na primeira onda.

3 HIPÓTESE DO TRABALHO

A hipótese testada no presente trabalho foi: a superovulação na primeira onda de crescimento folicular aumenta a resposta superovulatória, a quantidade e a qualidade dos embriões em doadoras Nelore (*Bos indicus*).

4 OBJETIVOS

Para testar a hipótese apresentada anteriormente, foram estabelecidos os seguintes objetivos:

- Comparar a resposta superovulatória de doadoras Nelore tratadas na primeira onda de crescimento folicular, e na onda sincronizada com progesterona e benzoato de estradiol.
- Comparar a qualidade dos oócitos de folículos superestimulados durante a primeira onda de crescimento folicular com e sem suplementação exógena de progesterona.
- Mensurar as concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular com e sem suplementação exógena de progesterona.
- Comparar a resposta superovulatória durante a primeira onda de crescimento folicular com e sem suplementação exógena de progesterona.

5 MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização do presente estudo, foram utilizadas 48 doadoras Nelore (*Bos indicus*), divididas em três experimentos.

5.1 EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS SUPEROVULATÓRIAS DA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E DA ONDA SINCRONIZADA COM BENZOATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (*BOS INDICUS*)

5.1.1 Animais e Local do Experimento

O experimento foi realizado na Fazenda Agropecuária Missões, localizada no município de Dourados (MS), distante 200km de Campo Grande (MS), que adota rotineiramente programa de colheita e transferência de embriões, apresentando instalações compatíveis com a técnica.

Foram utilizadas 18 vacas doadoras de embriões da raça Nelore, com idade entre quatro e oito anos. Os animais foram previamente submetidos a exame ultrassonográfico para detecção de ciclicidade, estando livres de brucelose e de tuberculose. Todos os animais foram suplementados com sal mineral de boa qualidade e água *ad libitum*.

5.1.2 Tratamentos

Os animais foram distribuídos homoganeamente em três grupos experimentais, de acordo com a idade e o escore corporal. As doadoras do Grupo 1 - Onda 1s/P4 e do Grupo 2 - Onda 1c/P4 foram superestimuladas na primeira onda de crescimento folicular, e as do Grupo 3 - SincBE+P4/P4 foram superestimuladas após a sincronização da emergência da onda folicular com a aplicação IM de 2,5mg de benzoato de estradiol (BE)¹ e 50,0mg de progesterona (P4)¹. Cada animal recebeu um dispositivo intravaginal (CIDR)² contendo P4² e 2,5mg de BE, associados a 50,0mg de P4¹ IM, em dia aleatório do ciclo estral (Dia 0; D0).

Os animais dos Grupos 1 - Onda 1s/P4 e 2 - Onda 1c/P4 receberam 0,15mg de d-cloprostenol³ (PGF_{2α}) IM no Dia 5 (D5). Os dispositivos inseridos nos animais desses grupos foram removidos no Dia 9 (manhã), e 12,5mg de LHp⁴ foram administrados no Dia 10 (manhã). O tratamento superovulatório desses Grupos foi iniciado 24 horas após o LHp (D11).

As fêmeas do Grupo 3 - SincBE+P4/P4 foram superestimuladas quatro dias após a inserção do CIDR e a aplicação do BE e da P4, de forma que os tratamentos superovulatórios de todos os grupos fossem iniciados no mesmo momento (Figura 1).

Todos os animais foram superestimulados com uma dose total de 133mg NIH-FSH-P1 de FSH⁵, diluída em 10ml e dividida em duas aplicações diárias (manhã e tarde) de 1ml por cinco dias (D11 a D15).

Os animais do Grupo 2 receberam um novo CIDR junto com a primeira administração de FSH. No último dia de tratamento (D15), junto com as doses de

¹ Index Farmacêutica, Brasil.

² CIDR[®], Pfizer, Brasil.

³ Preloban[®], Intervet, Holanda.

⁴ Lutropin[®], Bioniche, Canadá.

FSH foram administradas doses luteolíticas de PGF_{2α} (d-cloprostenol), e após a última aplicação foi removido o CIDR dos animais do Grupo 1 - Onda 1c/P4 e do Grupo 3 - SincBE+P4/P4. Todas as doadoras receberam 25mg de LHp 24 horas após o último tratamento de FSH (D16), e foram inseminadas artificialmente em tempo fixo (IATF) 12 e 24 horas após o tratamento com LHp (D17). Os embriões foram coletados pelo método não-cirúrgico e avaliados pelo mesmo médico veterinário sete dias após a IATF (D23; Figura 1).

⁵ Folltropin®, Bioniche, Canadá.

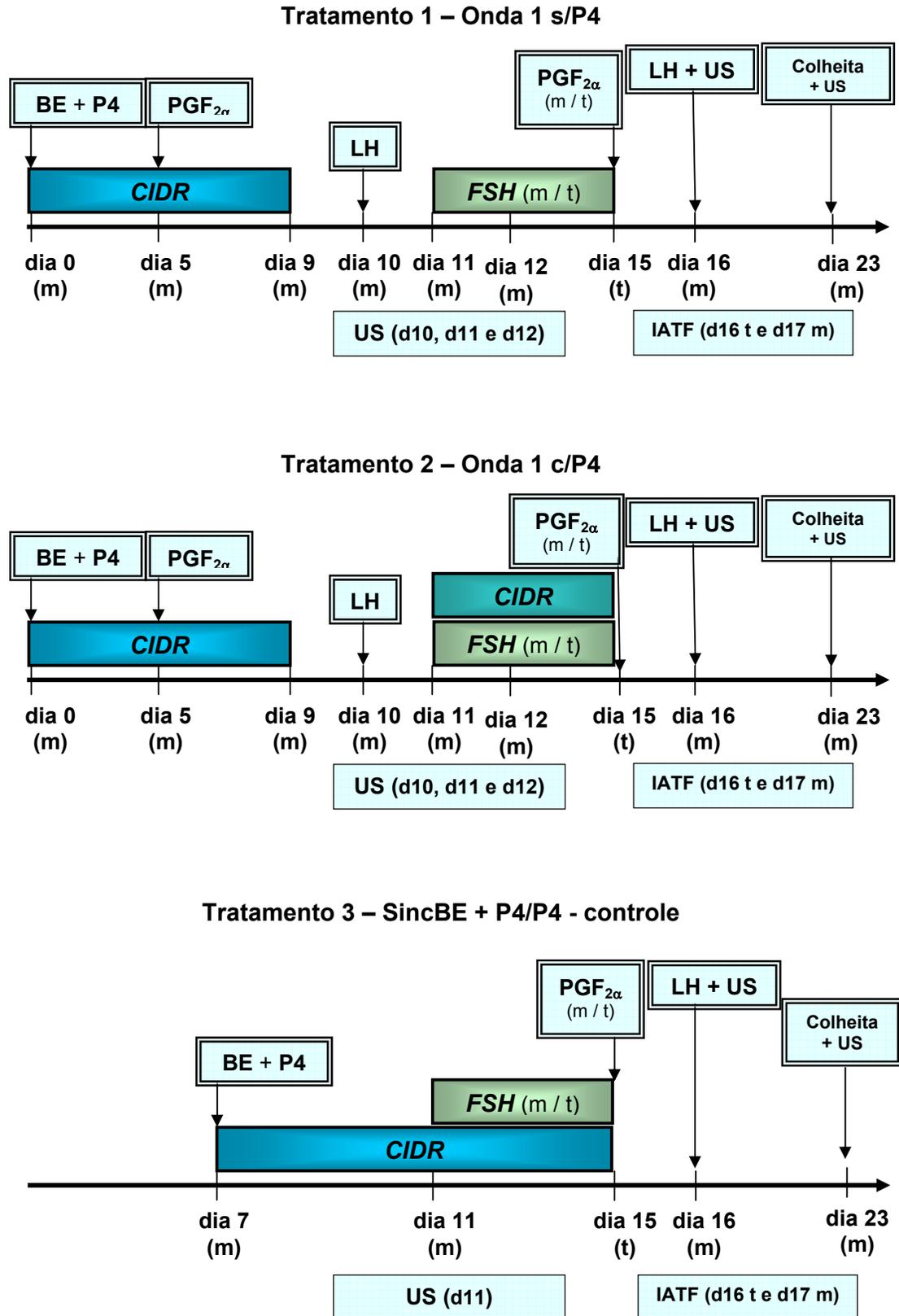


Figura 1 – Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados no Experimento 1

5.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS OÓCITOS APÓS A SUPERESTIMULAÇÃO NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (*BOS INDICUS*)

5.2.1 Animais e Local do Experimento

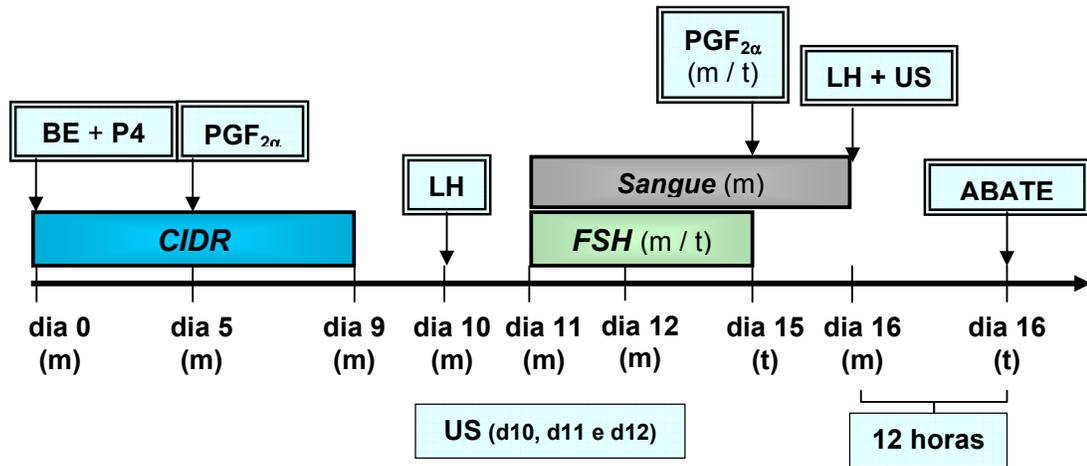
O experimento 2 foi realizado na Fazenda Botas, localizada no município de Campo Grande (MS), distante 15km daquela cidade.

Foram utilizadas dez vacas doadoras de embriões da raça Nelore, com idade entre 4 e 8 anos. A detecção de ciclicidade, os exames sanitários e a nutrição das doadoras foram realizados como descrito no item 5.1.1.

5.2.2 Tratamentos

A homogeneização e os tratamentos dos dois grupos experimentais, Grupo 1 - Onda 1 s/P4 e Grupo 2 - Onda 1 c/P4 foram realizados como descrito no item 5.1.2. A diferença é que neste experimento todos os animais foram abatidos 12 horas após receberem os 25mg de LHp, e seus ovários foram extraídos e levados a um laboratório comercial de fertilização *in vitro* (FIV - Figura 2).

Tratamento 1 - Onda 1 s/P4



Tratamento 2 - Onda 1 c/P4

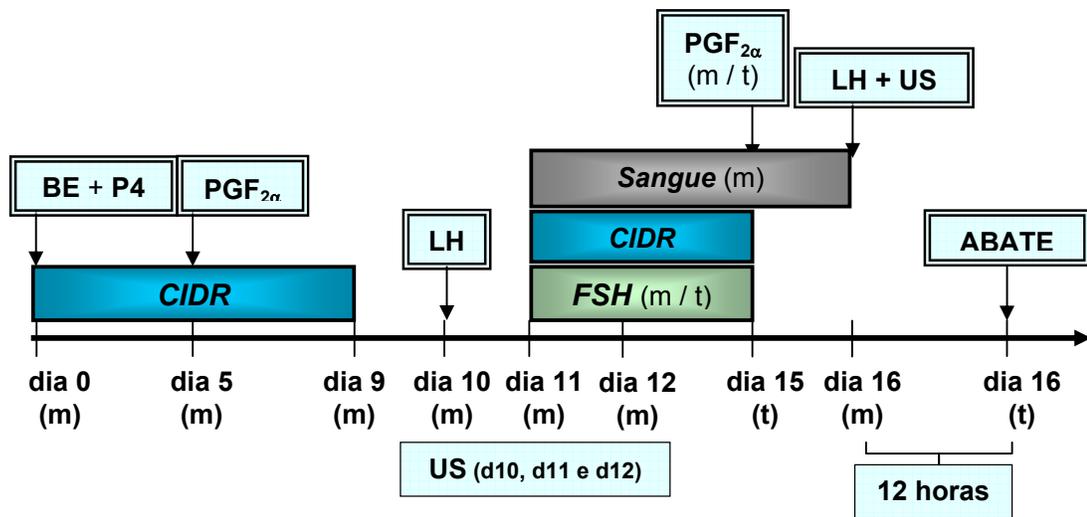


Figura 2 – Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados no Experimento 2

5.2.3 Aspiração e Classificação dos Oócitos

Os animais foram abatidos na tarde do Dia 16, 12 horas após a aplicação do LH, em frigorífico próximo à fazenda em que foram realizados os tratamentos. Os ovários foram transportados para o laboratório em solução fisiológica, dentro de garrafas térmicas a 35°C, para a aspiração e a classificação dos oócitos.

Os folículos ovarianos maiores que 8mm foram aspirados com seringa de 5ml acoplada a agulha 40x12mm. Após a aspiração, foram implementadas a procura, a classificação e a seleção dos oócitos. A classificação seguiu o critério de expansão do *cumulus oocyte complexes* (COC), que determina a maturação dos oócitos; aqueles que apresentaram COC expandido e com citoplasma homogêneo foram considerados maduros, e aqueles que apresentaram COC não expandido foram considerados imaturos.

5.3 EXPERIMENTO 3: RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (*BOS INDICUS*)

5.3.1 Animais e Local do Experimento

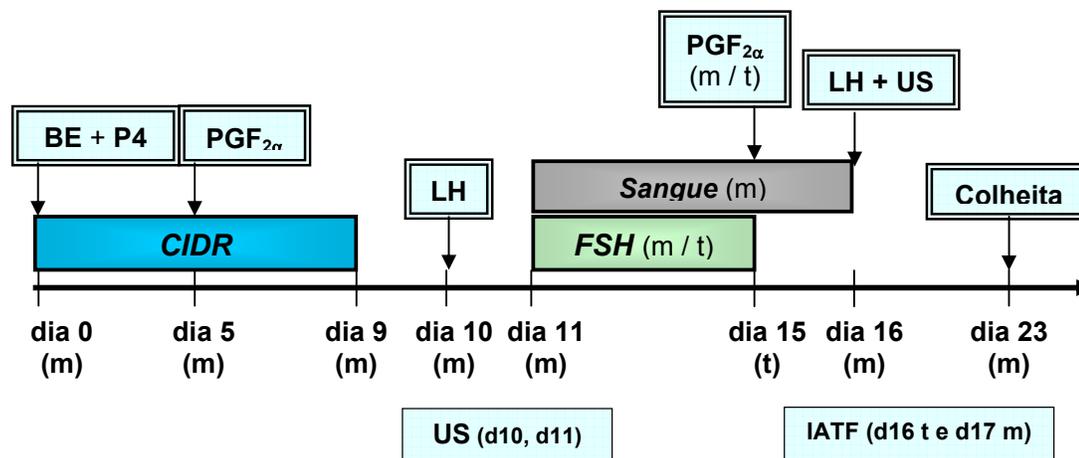
O experimento 3 foi realizado no mesmo local do experimento 2. Foram utilizadas 20 vacas doadoras de embriões da raça Nelore, com idade entre 4 e 8

anos. A detecção de ciclicidade, os exames sanitários e a nutrição das doadoras foram realizados como descrito no item 5.1.1.

5.3.2 Tratamentos

A homogeneização entre os dois grupos experimentais, Grupo 1 - Onda 1 s/P4 e Grupo 2 - Onda 1 c/P4 foi obtida como descrito no item 5.1.2. Os tratamentos empregados foram semelhantes àqueles descritos para os Grupos Onda 1 s/P4 e Onda 1 c/P4, respectivamente, no item 5.1.2. Os animais foram inseminados, 12 e 24 horas após a aplicação do LH, com sêmen do mesmo touro e da mesma partida. A colheita dos embriões foi realizada no Dia 23, por método não cirúrgico (Figura 3).

Tratamento 1 - Onda 1 s/P4



Tratamento 2 - Onda 1 c/P4

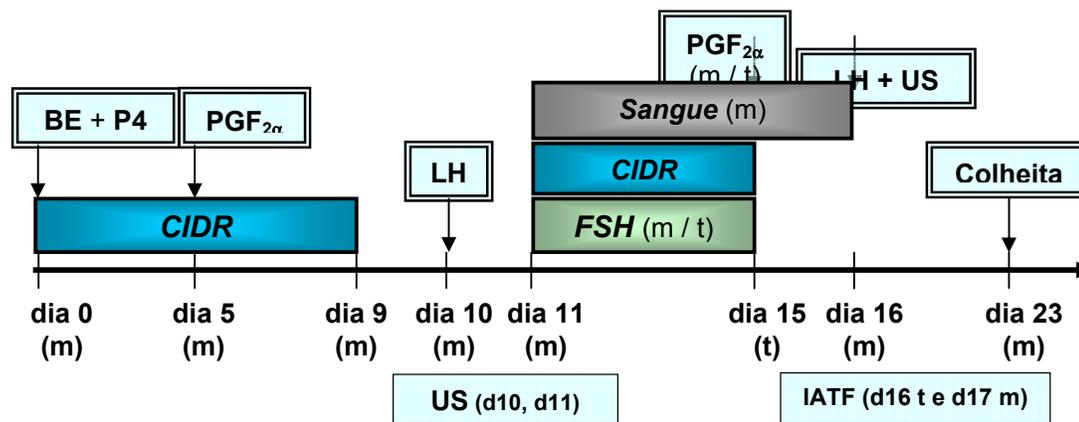


Figura 3 – Diagramas esquemáticos dos tratamentos empregados no Experimento 3

5.4 COLHEITA DOS EMBRIÕES

As colheitas de embriões dos experimentos 1 e 3 foram feitas pelo método não cirúrgico - lavagem uterina com solução tampão fosfato-salina (PBS) mais 1% de soro fetal bovino. Os embriões foram classificados como viáveis, degenerados ou não fecundados pelo mesmo médico veterinário. Os embriões viáveis foram classificados, de acordo com a sua qualidade, em grau 1 (excelente), grau 2 (bom), grau 3 (regular) ou grau 4 (pobre), de acordo com Lindner e Wright (1983). Os embriões graus 1 e 2 foram classificados como congeláveis, e os de grau 3 como transferíveis.

5.5 EXAMES ULTRA-SONOGRÁFICOS

Os exames ultra-sonográficos ovarianos de todos os experimentos foram realizados com o aparelho Aloka SSD 500⁶ munido de transdutor linear de 5,0Mhz. Do dia 10 ao dia 12 foram realizadas as avaliações da superfície ovariana, para constatação da emergência da primeira onda de crescimento folicular e da ovulação do FD (Grupos 1 e 2 dos três experimentos). Nos animais do Grupo 3 do experimento 1, as avaliações ovarianas foram feitas no Dia 11 - provável dia do início de onda pós sincronização com BE e P4 -, para verificação do início da emergência da onda folicular. No Dia 16 foram quantificados os folículos $\geq 8\text{mm}$, para verificar a

⁶ Aloka Co. Ltd., Tokyo, Japão.

resposta ao tratamento com FSH, em todos grupos dos três experimentos. No dia 23 foram mensurados o número de folículos ≥ 8 mm (considerados anovulatórios) e de corpos lúteos para determinação da taxa de ovulação em todos os grupos dos experimentos 1 e 3.

5.6 COLHEITA DE SANGUE E DOSAGEM DAS CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS DE PROGESTERONA

Durante o tratamento com FSH para a superovulação, até o dia da aplicação do LH, foram colhidas amostras diárias de sangue por punção da veia caudal - em tubos de vácuo de 10ml contendo heparina⁷ - dos animais dos experimentos 2 e 3. Após a colheita, as amostras foram mantidas sob refrigeração até o momento em que foram centrifugadas a 823g por 15 minutos⁸, para separação do plasma. O plasma foi retirado do tubo com o auxílio de pipeta, envasado em criotubo previamente identificado e armazenado a -20°C em freezer, até o momento da realização da dosagem hormonal.

As dosagens de P4 foram realizadas por radioimunoensaio (RIE)⁹ no Laboratório de Dosagens Hormonais (LDH) do Departamento de Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP). A sensibilidade de detecção do teste foi de 0,0076ng/ml, e os coeficientes de variação intra e interensaio foram inferiores a 10%.

⁷ Vacutainer®, Becton Dickinson & Company, EUA.

⁸ Centrífuga Excelsa Baby, Fanem®, Brasil.

⁹ Progesterone Coat-A-Count®, Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, EUA.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo programa *Statistical Analyses System 2000* (SAS System for Windows)¹⁰. Os dados foram testados quanto à normalidade dos resíduos e à homogeneidade das variâncias pelo aplicativo *Guided Data Analysis*. Caso não obedecessem às premissas, eram transformados (logaritmo na base 10 – $\text{Log}_{10}X$; Raiz quadrada – RQ X; Quadrado – X^2) e, se a normalidade não fosse obtida, empregava-se então o procedimento NPAR1WAY de análise de variância não paramétrica.

Para a descrição dos resultados de tendência central, foram empregados as médias e respectivos erros-padrão (média \pm erro padrão da média), bem como os níveis de significância (P) dos dados originais quando obedecessem às premissas. A mesma descrição foi empregada para os dados transformados, quando necessária à transformação. As variáveis-resposta binomiais foram descritas pelas suas proporções (porcentagens).

O nível de significância para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é: para um nível de significância menor que 0,05 considerou-se que ocorreram diferenças estatísticas entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta. Para o nível de significância de 0,05 até 0,1 considerou-se tendência estatística entre as variáveis comparadas.

¹⁰ SAS Institute Inc., Cary, NC, EUA, 1999-2000.

6 RESULTADOS

6.1 EXPERIMENTO 1: COMPARAÇÃO ENTRE AS RESPOSTAS SUPEROVULATÓRIAS DA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR E DA ONDA SINCRONIZADA COM BENZOATO DE ESTRADIOL E PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (*BOS INDICUS*)

Os efeitos dos tratamentos sobre a resposta superovulatória, a quantidade e a qualidade das estruturas embrionárias recuperadas nos animais do Experimento 1 são apresentados na tabela 1.

Não houve diferença na resposta superovulatória entre os grupos quanto ao número de folículos no dia da IATF (Onda1s/P4 = $21,5 \pm 6,6$ vs Onda1c/P4 = $18,5 \pm 4,5$ vs SincBE+P4/P4 = $23,0 \pm 3,7$; $P > 0,05$), ao número de CL no dia da colheita dos embriões (Onda1s/P4 = $15,3 \pm 4,3$ vs Onda1c/P4 = $12,7 \pm 2,7$ vs SincBE+P4/P4 = $14,5 \pm 2,5$; $P > 0,05$), à taxa de ovulação (Onda1s/P4 = $74,2 \pm 7,8$ vs Onda1c/P4 = $74,6 \pm 6,5$ vs SincBE+P4/P4 = $63,4 \pm 2,7$; $P > 0,05$) e à taxa de recuperação (Onda1s/P4 = $53,0 \pm 10,9$ vs Onda1c/P4 = $83,1 \pm 9,8$ vs SincBE+P4/P4 = $60,3 \pm 13,2$; $P > 0,05$).

Tabela 1 – Número de folículos no dia da IATF, número de CL no dia da colheita, taxa de ovulação, taxa de recuperação, quantidade e qualidade das estruturas embrionárias recuperadas, conforme grupo experimental. Dourados, 2002

	GRUPOS		
	Onda1s/P4	Onda1c/P4	SincBE+P4/P4
Número de animais	6	6	6
Nº de folículos no dia da IATF	21,5 ± 6,6	18,5 ± 4,5	23,0 ± 3,7
Nº de CL no dia da colheita	15,3 ± 4,3	12,7 ± 2,7	14,5 ± 2,5
Taxa de ovulação (%)	74,2 ± 7,8	74,6 ± 6,5	63,4 ± 2,7
Taxa de recuperação (%)	53,0 ± 10,9	83,1 ± 9,8	60,3 ± 13,2
Total de estruturas	8,3 ± 2,9	11,7 ± 2,9	9,2 ± 2,3
Embriões transferíveis	0,2 ± 0,2 ^a	8,0 ± 1,8 ^b	6,6 ± 2,0 ^b
Embriões congeláveis	0,0 ± 0,0 ^a	5,8 ± 1,4 ^b	5,1 ± 1,7 ^b
Estruturas não fecundadas	7,0 ± 2,7 ^a	2,5 ± 1,6 ^b	2,5 ± 1,2 ^b

As médias nas linhas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b, P<0,05).

Embora não tenha sido verificada diferença no total de estruturas colhidas entre os grupos experimentais (Onda1s/P4 = 8,3 ± 2,9 vs Onda1c/P4 = 11,7 ± 2,0 vs SincBE+P4/P4 = 9,2 ± 2,3; P>0,05), os Grupos Onda 1c/P4 e SincBE+P4/P4 apresentaram maior número (P<0,05) de embriões transferíveis (Onda1c/P4 = 8,0 ± 1,8 e SincBE+P4/P4 = 6,6 ± 2,0) e congeláveis (Onda1c/P4 = 5,8 ± 1,4 e SincBE+P4/P4 = 5,1 ± 1,7) do que o grupo Onda 1 s/P4 (0,2 ± 0,2 e 0,0 ± 0,0, respectivamente). Em contrapartida, observou-se maior número de estruturas não fertilizadas (P<0,05) no grupo de doadoras que não receberam dispositivo intravaginal contendo progesterona durante o tratamento superovulatório (Grupo Onda1s/P4, 7,0 ± 2,7) do que nos grupos Onda1c/P4 (2,5 ± 1,6) e SincBE+P4/P4 (2,5 ± 1,2).

6.2 EXPERIMENTO 2: AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS OÓCITOS APÓS A SUPERESTIMULAÇÃO NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (*BOS INDICUS*)

Os efeitos dos tratamentos sobre a resposta superovulatória e sobre a quantidade de estruturas recuperadas – e respectiva classificação - nos animais do Experimento 2 estão descritos na tabela 2.

Tabela 2 – Taxa de ovulação no início da SPO, número de folículos no dia do LH, taxa de luteólise, quantidade de folículos grandes no dia da segunda aplicação de LH, total de oócitos recuperados (maturados, não maturados e atrésicos) de doadoras Nelore superovuladas na primeira onda de crescimento folicular com ou sem suplementação exógena de progesterona. Campo Grande, 2004

	GRUPOS	
	Onda1s/P4	Onda1c/P4
Número de animais	5	5
Taxa de ovulação início da SPO	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)
Número de FG no dia do LH	19,60 ± 5,29	28,0 ± 7,35
Taxa de luteólise ao final da SPO (P4<1 ng/ml; %)	60,0 (3/5)	100,0 (5/5)
Oócitos recuperados	18,00 ± 6,08	23,00 ± 5,24
Oócitos maturados	10,80 ± 6,58 ^x	21,80 ± 5,86 ^y
Oócitos não maturados	6,40 ± 2,77 ^a	1,20 ± 0,97 ^b
Oócitos atrésicos	0,80 ± 0,49 ^c	0,0 ± 0,0 ^d

As médias nas linhas com letras sobrescritas diferentes apresentam diferença estatística (a,b P<0,05; x,y P=0,10; c,d P<0,10)

Todos os animais dos Grupos Onda1s/P4 e Onda1c/P4 ovularam após o protocolo de sincronização da ovulação para estabelecer o início do tratamento superovulatório.

Os animais dos grupos Onda1s/P4 e Onda1c/P4 não apresentaram diferença na resposta superovulatória. O número de folículos grandes no momento

da aplicação do LH (Onda1s/P4 = $19,60 \pm 5,29$ vs Onda1c/P4 = $28,0 \pm 7,35$) e o número de oócitos recuperados (Onda1s/P4 = $18,00 \pm 6,08$ vs Onda1c/P4 = $23,00 \pm 5,24$) foram semelhantes entre os grupos ($P > 0,05$). No entanto, as doadoras que receberam um dispositivo intravaginal contendo progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular apresentaram tendência ($P = 0,10$) de maior quantidade de oócitos maturados do que aquelas não tratadas (Onda1c/P4 = $21,80 \pm 5,86$ vs Onda1s/P4 = $10,80 \pm 6,58$) e, por consequência, tiveram menor quantidade de oócitos não maturados (Onda1c/P4 = $1,20 \pm 0,97$ vs Onda1s/P4 = $6,40 \pm 2,77$; $P < 0,05$).

O gráfico 1 apresenta as concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório em cada grupo experimental desse experimento, bem como as suas comparações estatísticas.

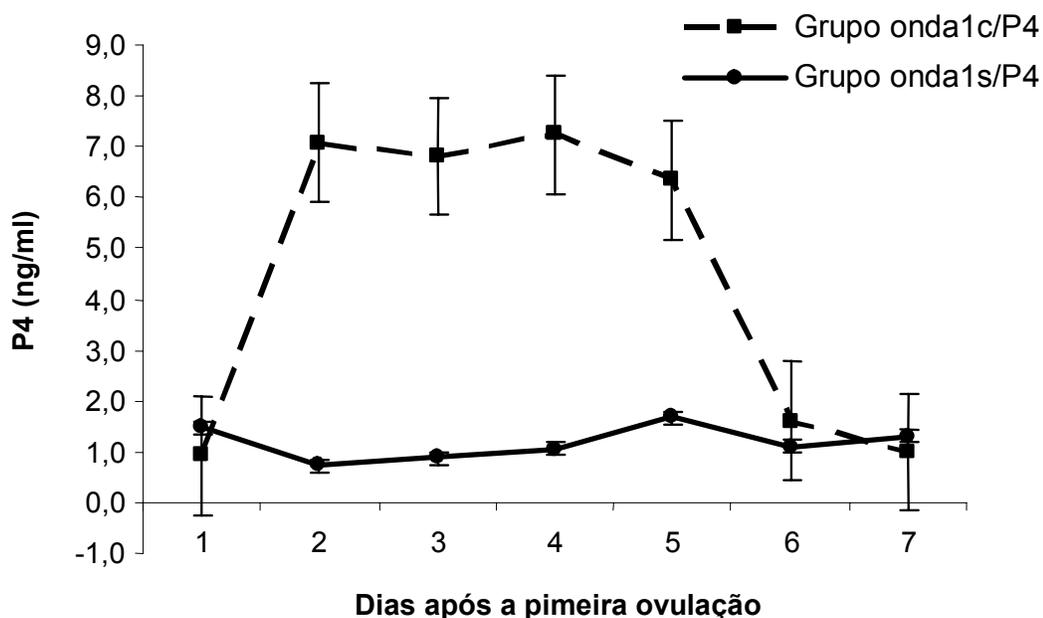


Gráfico 1 - Concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore com ou sem suplementação exógena de progesterona. Campo Grande, 2004. (letras diferentes no mesmo dia denotam diferença estatística, $P < 0,05$)

A taxa de luteólise ao final da SPO (P4 <1ng/ml) foi de 60 % (3/5) para os animais do grupo Onda 1 s/P4 e de 100 % para os animais do grupo Onda 1 c/P4 (5/5; P>0,05).

Verificou-se que a inserção do dispositivo intravaginal contendo progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular aumentou (P>0,05) as concentrações plasmáticas de progesterona durante os dias 2, 3, 4, e 5 após a ovulação.

6.3 EXPERIMENTO 3: RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA NA PRIMEIRA ONDA DE CRESCIMENTO FOLICULAR COM OU SEM SUPLEMENTAÇÃO EXÓGENA DE PROGESTERONA EM DOADORAS NELORE (*BOS INDICUS*)

As respostas ao tratamento de sincronização da ovulação e à superovulação nos animais do Experimento 3, de acordo com o grupo experimental, são apresentadas na tabela 3.

Assim como no Experimento 2, verificou-se que a totalidade dos animais ovularam com o protocolo de sincronização de ovulação para estabelecer o início do tratamento de superovulação.

O tratamento superovulatório (número de FG no final da SPO) promoveu respostas semelhantes nos dois grupos experimentais (Onda 1 s/P4 = $19,9 \pm 2,2$ e Onda 1 c/P4 = $14,5 \pm 3,5$; P>0,05). No entanto, o número de corpos lúteos (Onda 1 s/P4 = $14,6 \pm 1,7$ e Onda 1 c/P4 = $9,1 \pm 2,2$; P<0,1) apresentou tendência (P<0,1) de aumento no grupo Onda 1 s/P4 e a taxa de recuperação (Onda 1 s/P4 = $31,0 \pm 10,7$ e Onda 1 c/P4 = $54,8 \pm 11,1$; P<0,1) apresentou tendência (P<0,1) de aumento no grupo Onda 1 c/P4.

Tabela 3 – Resposta ao tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular em doadoras Nelore (*Bos indicus*) com ou sem suplementação exógena de progesterona. Campo Grande, 2004

	GRUPOS	
	Onda1s/P4	Onda1c/P4
Número de animais	10	10
Taxa de ovulação início SPO (%)	100,0 (10/10)	100,0 (10/10)
Número de FG no final da SPO	19,9 ± 2,2	14,5 ± 3,5
Taxa de luteólise final SPO (P4<1 ng/ml; %)	80,0 (8/10)	90,0 (9/10)
Taxa de ovulação após SPO (%)	76,9 ± 7,6	69,2 ± 8,4
Número de CL	14,6 ± 1,7 ^x	9,1 ± 2,2 ^y
Taxa de recuperação (%)	31,0 ± 10,7 ^x	54,8 ± 11,1 ^y
Total de estruturas	4,0 ± 1,5	4,7 ± 1,1
Embriões congeláveis	0 ^b	3,0 ± 0,9 ^a
Embriões transferíveis	0 ^b	3,9 ± 1,1 ^a
Degenerados	0,2 ± 0,2	0,4 ± 0,3
Não fertilizados	2,5 ± 0,7 ^a	0,2 ± 0,2 ^b

As médias nas linhas com letras sobreescritas diferentes apresentam tendência de diferença estatística (x,y P<0,1) e (a,b P<0,05).

Embora a taxa de luteólise no final da SPO (P4 <1ng/ml) tenha sido semelhante entre os grupos (P>0,05), 10% dos animais no grupo Onda 1 c/P4 e 20% dos animais no grupo Onda 1 s/P4 ovularam na presença de concentrações plasmáticas de P4 acima de 1 ng/ml.

A quantidade e a classificação dos embriões produzidos nesse experimento são apresentadas na Tabela 3. Nesse experimento um animal do grupo onda1s/P4 foi considerado *outlier*, razão pela qual não foi considerado nas análises estatísticas.

Os grupos não diferiram quanto ao total de estruturas colhidas (Onda 1 s/P4 = 4,0 ± 1,5 e Onda 1 c/P4 = 4,7 ± 1,1; P>0,05). No entanto, o Grupo Onda 1c/P4 apresentou maior quantidade de embriões congeláveis (3,0 ± 0,9; P<0,05) e de transferíveis (3,9 ± 1,1; P<0,05) que o Grupo Onda 1s/P4 (0,0 ± 0,0 e 0,0 ± 0,0). Conseqüentemente, o Grupo Onda 1s/P4 apresentou maior quantidade de

estruturas não fertilizadas (Onda 1 s/P4 = $2,5 \pm 0,7$ e Onda 1 c/P4 = $0,2 \pm 0,2$; $P < 0,05$).

O gráfico 2 mostra as concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório em cada grupo experimental, bem como suas comparações estatísticas.

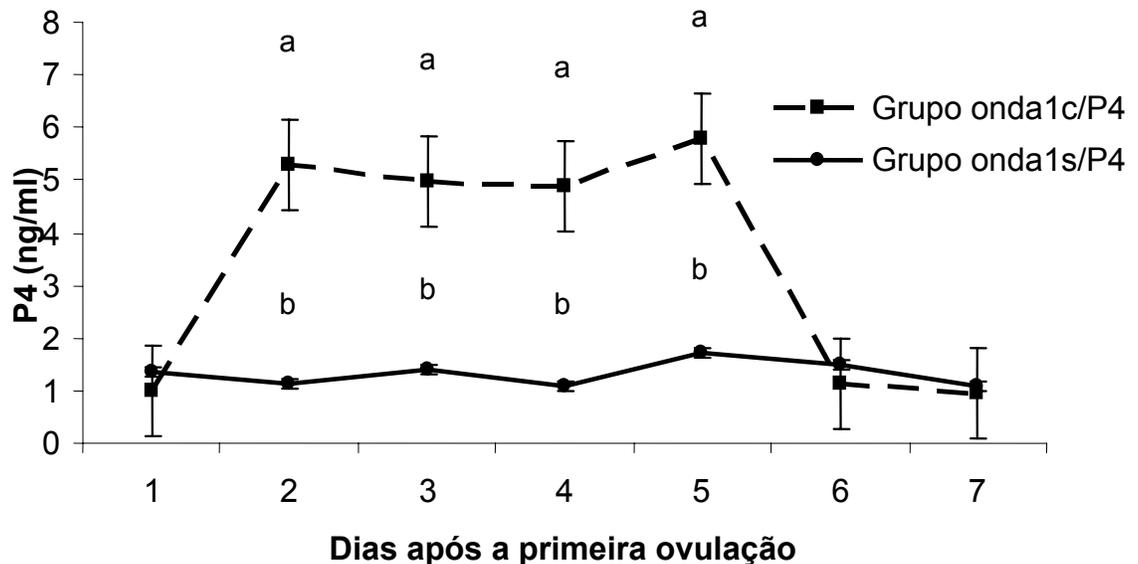


Gráfico 2 - Concentrações plasmáticas de progesterona durante o tratamento superovulatório na primeira onda de crescimento folicular nos grupos do Experimento 3 (onda1s/P4) e (onda1c/P4). Campo Grande, 2004. (letras diferentes no mesmo dia denotam diferença estatística, $P < 0,05$)

Pela análise dos resultados apresentados no gráfico 2, verificou-se que a inserção do dispositivo intravaginal contendo progesterona durante o tratamento superovulatório de folículos da primeira onda de crescimento folicular aumentou ($P < 0,05$) as concentrações plasmáticas de progesterona durante os dias 2, 3, 4, e 5 após a ovulação.

7 DISCUSSÃO

O presente estudo, subdividido em três experimentos, reportou pela primeira vez as respostas a tratamentos superovulatórios realizados na primeira onda de crescimento folicular em doadora Nelore (*Bos indicus*). Trabalhos anteriores com fêmeas *Bos taurus* já haviam demonstrado a viabilidade de superestimular folículos da primeira onda folicular para programas de transferência de embriões (ADAMS et al., 1994; NASSER et al., 1993).

Nasser et al. (1993) demonstraram que o protocolo de SPO na primeira onda de crescimento folicular apresenta melhores resultados quando os tratamentos com FSH têm início em momento próximo à ovulação, período do pico endógeno de FSH responsável pela emergência da primeira onda de crescimento folicular (ADAMS et al., 1992b). Tratamentos iniciados um ou dois dias após a ovulação apresentaram resposta superovulatória significativamente inferior àqueles cujo início se deu em momento próximo à ovulação (NASSER et al., 1993). Entretanto, a necessidade de observação da manifestação do estro e do emprego de exames ultra-sonográficos diários para determinar a ovulação para o início do tratamento superovulatório faz com que esse protocolo seja considerado de menor praticidade que os programas tradicionais de SPO em larga escala.

O presente estudo empregou um protocolo para controlar a dinâmica folicular e a ovulação em períodos programados, dispensando a detecção do comportamento de estro e de exames ultra-sonográficos diários. Para tanto, foram utilizadas combinações de P4 e BE (BO et al., 2002) para sincronização do início da onda de crescimento folicular e do folículo pré-ovulatório. O folículo dominante dessa

onda foi induzido a ovular com a administração de LH, dando início à primeira onda de crescimento folicular. Todos os animais dos três experimentos realizados neste estudo ovularam após os tratamentos de sincronização da ovulação, e os tratamentos superovulatórios foram iniciados no momento considerado mais apropriado para protocolos de SPO na primeira onda de crescimento folicular. Essa alta taxa de ovulação demonstra a eficácia e a confiabilidade do protocolo empregado para a indução da primeira onda de crescimento folicular.

A presença de dois grupos superovulados na primeira onda, um sem (Onda 1 s/P4) e outro com (Onda 1 c/P4) suplementação exógena de P4 no Experimento 1 teve como objetivo a obtenção de maiores níveis circulantes de P4 durante a SPO, positivamente correlacionados à qualidade embrionária (BERGFELT et al., 1997; CALLESEN; GREVE; HYTELL, 1986; CHAGAS; COSTA; SILVA, 2002), pois o protocolo de SPO na primeira onda é realizado na presença de um CL ainda em crescimento, que produz pouca P4 (NASSER et al., 1993).

No Experimento 1, não houve diferenças no número de folículos que responderam ao tratamento superovulatório (número de folículos no dia da IATF), na quantidade de CL no dia da colheita, na taxa de ovulação, na taxa de recuperação e no total de estruturas colhidas entre os animais do grupo submetido ao protocolo tradicional de sincronização da emergência da onda folicular com BE+P4 (Grupo SincBE+P4/P4), e aqueles submetidos à superovulação na primeira onda de crescimento folicular (Grupos Onda 1). Resultados semelhantes são relatados na literatura para *Bos taurus* (ADAMS et al., 1994). No entanto, no Experimento 1, as doadoras que foram superovuladas sem a suplementação exógena de P4 durante os tratamentos com FSH (Grupo Onda 1 s/P4) apresentaram redução significativa no número de embriões transferíveis e congeláveis. Tais achados não são semelhantes

àqueles de Adams (1994), que compararam a resposta superovulatória da primeira e da segunda onda de crescimento folicular em *Bos taurus*. Entretanto, a produção e a qualidade dos embriões do grupo submetido ao protocolo de superovulação na primeira onda de crescimento folicular com adição de progesterona exógena (Onda 1 c/P4) não foram inferiores às do grupo em que a onda foi sincronizada com BE+P4. O número de embriões viáveis constatado no Grupo Onda 1c/P4 ($8,0 \pm 4,5$) e Grupo SincBE+P4/P4 ($6,7 \pm 4,8$) reflete a capacidade superovulatória dos folículos estimulados após a ovulação e após a sincronização com BE+P4 em responder aos tratamentos com FSH, resultado relativamente semelhante àqueles obtidos por Adams (1994).

Para verificar se o comprometimento na qualidade das estruturas colhidas tinha origem nos oócitos foi delienado um segundo experimento, que averigüou os efeitos da suplementação exógena de P4 na qualidade dos oócitos aspirados de folículos superestimados durante a primeira onda de crescimento folicular. Os animais do grupo Onda1 c/P4 apresentaram níveis de progesterona estatisticamente maiores que os animais do Grupo Onda1 s/P4 durante todo o tratamento superovulatório, demonstrando que os folículos foram estimulados sob diferentes concentrações de progesterona.

Nesse experimento (Experimento 2), a quantidade de folículos > que 8mm aspirados após o abate e o total de oócitos recuperados foram equivalentes nos dois grupos tratados (Onda 1 s/P4 ; $18,00 \pm 6,08$ e Onda 1 c/P4 ; $23,00 \pm 5,24$), e numericamente superiores aos registrados em estudo anterior com folículos estimulados sem controle da emergência folicular ($13,6 \pm 0,9$; CALLESEN; GREVE; HYTELL, 1986). Essa diferença pode ser conseqüência do maior número de

folículos recrutados por onda em animais Nelore (*Bos indicus*) em relação a animais *Bos taurus* (CARVALHO et al., 2004).

Embora não tenha ocorrido diferença quanto à quantidade de folículos que responderam ao tratamento SPO o número de oócitos maturados ($P = 0,01$) foi melhor no Grupo Onda 1 c/P4, o que sugere que os níveis de progesterona durante os protocolos de superovulação na primeira onda de crescimento folicular têm influência sobre a maturação oocitária. Nos mamíferos, os esteróides têm papel importante na maturação oocitária, podendo inibir ou iniciar a meiose. Assim, é essencial que exista um equilíbrio dos esteróides para que os oócitos sintetizem as proteínas necessárias para completar a meiose (GREVE et al., 1995). Distúrbios da esteroidogênese *in vivo* alteram a síntese protéica pelos oócitos, com efeitos mais severos quando há alteração na relação estrógeno/progesterona (GREVE et al., 1995). Revah e Butler (1996) superestimularam doadoras sob baixas concentrações de progesterona, e observaram que os oócitos dos folículos desses animais completaram prematuramente a meiose.

No Experimento 2, a maturação dos oócitos ficou definida somente pela expansão do *cumulus oocyte complexes*. Mudanças ultra-estruturais nos oócitos não foram avaliadas nesse experimento. Os resultados encontrados corroboraram com os achados no Experimento 1, e poderiam se constituir em possível explicação para a diferença constatada entre os grupos superovulados com e sem P4.

O Experimento 3 foi realizado *in vivo* com o objetivo de confirmar o resultado dos experimentos anteriores. A quantidade de estruturas colhidas ($4,0 \pm 1,5$ e $4,7 \pm 1,1$) também não diferiu entre os grupos Onda 1 s/P4 e Onda 1 c/P4. Da mesma forma que ocorreu no Experimento 2, verificou-se diferença significativa nas concentrações de P4 durante o tratamento superovulatório. Nesse Experimento, a

qualidade embrionária também foi estatisticamente inferior no grupo superovulado sem suplementação exógena de P4, confirmando os resultados do Experimento 1.

Esse comprometimento na qualidade embrionária encontrado no Grupo Onda 1 s/P4 poderia, em parte, ser explicado por uma incompleta regressão do CL após o tratamento superovulatório na primeira onda (BERGFELT et al., 1997). Momont e Seguin (1984) demonstraram, em vacas não superestimuladas, que o tratamento com prostaglandina antes do dia 5 do ciclo estral não é eficaz na indução da luteólise. Também há registro de baixa resposta à prostaglandina em animais *Bos indicus*, ainda que tratados na fase mais adiantada do ciclo estral (PINHEIRO et al., 1998). Em animais *Bos taurus*, durante o protocolo de superovulação na primeira onda de crescimento folicular, todos os animais responderam a luteólise após a administração de duas doses de prostaglandina no último dia do tratamento com FSH (Dia 5; ADAMS et al., 1994; NASSER et al., 1993).

No presente experimento, algumas doadoras apresentaram concentrações plasmáticas de P4 superiores a 1ng/ml no dia da IA, sugerindo ausência de resposta ao tratamento com prostaglandina em *Bos indicus* com o mesmo protocolo. No entanto Callesen, Greve e Hytell (1986) mencionam alteração no perfil de P4 em 32% das doadoras cujo tratamento superovulatório teve início no meio do ciclo. Tais animais apresentaram níveis de P4 >1ng/ml 24 horas após a PGF. A alta concentração plasmática de progesterona no momento da ovulação está associada à baixa taxa de fertilização, diminuindo a viabilidade do embrião (CALLESEN; GREVE; HYTELL, 1986). A análise individual dos animais que integraram os grupos do presente trabalho indica que aqueles que apresentaram taxas de progesterona >1ng/ml no momento da inseminação artificial tiveram a resposta embrionária prejudicada, não produzindo nenhuma estrutura viável, à semelhança do que

mencionam estudos anteriores (CALLESEN GREVE; HYTELL, 1986; DIELEMAN; BEVERS, 1993). Já foi reportado que animais que apresentaram níveis de progesterona no estro de 0,6ng/ml produziram mais de cinco embriões transferíveis, e que animais que apresentaram níveis de 1,4ng/ml produziram somente estruturas não fecundadas, corroborando os achados da presente investigação (WANG et al., 1987). Entretanto, com as fêmeas do Grupo Onda 1 c/P4 pode ter ocorrido o comprometimento da formação do CL pela exposição a elevados níveis de P4 logo após a ovulação, provavelmente pela diminuição da frequência dos pulsos de LH (RAJAMAHENDRAN; MANIKKAN, 1994) e pelo aumento dos níveis de 17 β estradiol (AUSTIN et al., 2002) durante o tratamento superovulatório na primeira onda folicular. Como esse Grupo era suplementado com P4 exógena, após a retirada do dispositivo intravaginal ocorreu queda nos níveis plasmáticos desse hormônio (< 1ng/ml), de acordo com o perfil endocrinológico verificado na fase estrogênica do ciclo estral, sem comprometer a viabilidade do embrião (CALLESEN; GREVE; HYTELL, 1986; WANG et al., 1987). Chagas, Costa e Silva (2002) constataram efeito da concentração de P4 durante o tratamento superovulatório na qualidade dos embriões, à semelhança do que foi observado no presente experimento. Os autores verificaram que doadoras para MOET superovuladas na presença de baixas concentrações de P4 no diestro apresentam comprometimento na quantidade e na qualidade dos embriões produzidos. De acordo com Goto et al. (1988), níveis de P4 acima de 3,0ng/ml durante o tratamento superestimulatório estão associados a oito ou mais embriões transferíveis, enquanto que doadoras que apresentam níveis de P4 abaixo de 3,0ng/ml produzem somente dois embriões viáveis. E concluem que essa baixa eficiência é devida à baixa capacidade esteroidogênica dos folículos superestimulados, que compromete a competência oocitária.

Callesen, Greve e Hytell. (1986) classificaram as doadoras em duas categorias, de acordo com padrão endocrinológico da P4 e do LH no período pré-ovulatório, e concluíram que animais com padrão fisiológico normal para esses hormônios apresentam sincronização da maturação nuclear dos oócitos e da esteroidogênese, produzindo oócitos e embriões de melhor qualidade. Em contrapartida, a outra categoria de doadoras, caracterizada por desequilíbrio no balanço endócrino entre a P4 e o LH, apresentaram oócitos com assincronia da maturação nuclear, acarretando comprometimento na qualidade dos embriões produzidos.

As concentrações plasmáticas de progesterona são fatores regulador dos pulsos de LH (FORTUNE; RIVERA, 1999), limitando ou estimulando o crescimento do FD (RAJAMAHENDRAN; MANIKKAN, 1994). A superovulação na primeira onda de crescimento folicular ocorre concomitantemente ao crescimento do CL e da concentração de P4, e provavelmente sob aumento da frequência dos pulsos de LH. Um grande número de folículos em crescimento na presença de baixa concentração de P4 estaria associado a elevadas concentrações de 17β estradiol, alterando o ambiente intrafolicular (AHMAD et al., 1995; WEHRMAN et al., 1997). Desta forma, o oócito ficaria exposto a elevadas concentrações de estradiol e ao aumento da frequência de LH por um longo período, o que poderia induzir a ativação prematura da meiose e a maturação espontânea (rompimento da vesícula germinativa) desses oócitos (AHMAD et al., 1995). Assim, após a indução da ovulação com LH exógeno, as doadoras superovuladas poderiam eliminar oócitos comprometidos e com baixa capacidade de fertilização (CALLESEN; GREVE; HYTELL, 1986).

É possível especular, também, que a exposição a altas concentrações de estradiol - que normalmente aconteceria próximo do cio - poderia interferir no

transporte dos gametas e no meio ambiente do oviduto, impossibilitando a fertilização e o desenvolvimento embrionário (GREVE et al., 1995; VOS et al., 1996). Van De Leemput et al. (2001), que utilizaram protocolos de superovulação com atraso do pico de LH, verificaram diminuição da qualidade embrionária. Concluíram que o atraso na indução do pico de LH não afetou a maturação oocitária e conseqüentemente a fertilização, mas alterou o desenvolvimento embrionário nos primeiros estágios de divisão celular em virtude da redução da atividade secretora das células epiteliais do oviduto. Essa pode ser uma possível explicação para a redução na qualidade dos embriões produzidos no Grupo Onda 1 s/P4.

Embora o protocolo para superovulação na primeira onda de crescimento folicular em doadoras *Bos indicus* tenha apresentado resultados positivos somente com a suplementação exógena de P4, ele se constitui em uma alternativa, bem como em uma possibilidade para programas de MOET em países nos quais o emprego de estrógenos para sincronização da emergência da onda de crescimento folicular não é permitido.

8 CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo não confirmam a hipótese proposta, e permitem concluir que:

- A produção de embriões viáveis em doadoras tratadas na primeira onda de crescimento folicular com suplementação exógena de progesterona foi semelhante àquela verificada em doadoras superovuladas na onda induzida com P4+BE, e superiores àquela de doadoras tratadas primeira onda sem suplementação exógena de progesterona, nas quais ocorreu comprometimento na qualidade dos embriões produzidos.
- O número de oócitos não maturados foi maior no grupo superovulado na primeira onda de crescimento folicular sem suplementação exógena de progesterona.
- Os animais superovulados com suplementação exógena de progesterona apresentaram concentrações plasmáticas de P4 maiores que os animais que não receberam essa suplementação durante o tratamento na primeira onda de crescimento folicular.
- Animais *Bos indicus* superovulados na primeira onda de crescimento folicular sem suplementação exógena de progesterona apresentam maior número de estruturas não fecundadas.

REFERÊNCIAS¹

ADAMS, G. P. Control of ovarian follicle wave dynamics in cattle: Implications for synchronization and superstimulation. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 1, p. 19-24, 1994.

ADAMS, G. P.; KOT, K.; SMITH, C. A.; GINTHER, O. J. Effect of the dominant follicle on regression of its subordinates. **Canadian Journal Animal Science**, Ottawa, v. 73, n. 1, p. 267-275, 1992a.

ADAMS, G. P.; MATTERI, R. L.; KASTELIC, J. P.; KO, J. C. H.; GINTHER, O. J. Association between surges of follicle-stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 94, n. 1, p. 177-188, 1992b.

ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; BO, G. A.; GARCIA, A.; DEL CAMPO, M. R.; MAPLETOFT, R. J. Superstimulatory response of ovarian follicles of Wave 1 versus Wave 2 in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 7, p. 1103-1113, 1994.

AHMAD, N.; SCHRICK, F. N.; BUTCHER, R. L.; INSKEEP, E. K. Effect of persistent follicles on early embryonic losses in beef cows. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 52, n. 5, p. 1129-1135, 1995.

ALVAREZ, P.; SPICER, L. J.; CHASE JR., C. C.; PAYTON, M. E.; HAMILTON, T. D.; STEWART, R. E.; HAMMOND, A. C.; OLSON, T. A.; WETTEMANN, R. P. Ovarian and endocrine characteristics during and estrous cycle in Angus, Brahman, and Senepol cows in a subtropical environment. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 78, n. 5, p. 1291-1302, 2000.

AUSTIN, E. J.; MIHM, M.; EVANS, A. C. O.; IRELAND, L. H.; IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Effects of oestradiol and progesterone on secretion of gonadotrophins and health of first wave follicles during the oestrus cycle of beef heifers. **Reproduction**, Cambridge, v. 124, n. 4, p. 531-541, 2002.

BARROS, C. M.; NOGUEIRA, M. F. G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, New York, v. 56, n. 9, p. 1483-1496, 2001.

¹ Conforme as diretrizes para apresentação de dissertações e teses na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. 4. ed. São Paulo: FMVZ-USP, 2003. 84 p.

BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; PINHEIRO, O. L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 19, n. 1-2, p. 9-12, 1995.

BARUSELLI, P. S.; MARQUES, M. O.; REIS, E. L.; NASSER, L. F.; SILVA, R. C. P.; MENEGATTI, J. A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I. C. C. Adequação da dose de FSH (Follitropin-V) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo. **Acta Scientae Veterinaire**, v. 31, p. 53-62, 2003. Trabalho apresentado à 17. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, Fortaleza, 2003.

BERGFELT, D. R.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J.; ADAMS, G. P. Superovulatory response following ablation-induced follicular wave emergence at random stages of the oestrus cycle in cattle. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 49, n. 1, p. 1-12, 1997.

BERGFELD, E. G. M.; KOJIMA, F. N.; WEHRMAN, M. E.; CUPP, A. S.; PETERS, K. E.; MARISCAL, V.; SANCHEZ, T.; KITOK, R. J.; GARCIA-WINDER, M.; KINDER, J. E. Frequency of luteinizing hormone pulses and circulating 17β -oestradiol concentration in cows is related to concentration of progesterone in circulation when the progesterone comes from either an endogenous or exogenous source. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 37, n. 3, p. 257-265, 1995.

BERGFELT, D. R.; LIGHTFOOT, K. C.; ADAMS, G. P. Ovarian synchronization following ultrasound-guided transvaginal follicle ablation in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 6, p. 895-907, 1994.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; CACCIA, M.; MARTÍNEZ, M.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian follicular wave emergence after treatment with progestogen and oestradiol in cattle. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 39, n. 3, p. 193-204, 1995a.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; NASSER, L. F.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of estradiol valerate on ovarian follicles emergence of follicular waves and circulating gonadotropins in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 40, n. 2, p. 225-239, 1993.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Effect of progestogen plus E- 17β treatment on superovulatory response in beef cattle. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 5, p. 897-910, 1996a.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. Exogenous control of follicular development in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 1, p. 31-40, 1995b.

BO, G. A.; ADAMS, G. P.; PIERSON, R. A.; TRIBULO, H. E.; CACCIA, M.; MAPLETOFT, R. J. Follicular wave dynamics after estradiol-17 β treatment of heifers with or without a progestogen implant. **Theriogenology**, New York, v. 41, n. 8, p.1555-1569, 1994a.

BO, G. A.; BARUSELLI, P. S.; MORENO, D.; CUTAIA, L.; CACCIA, M.; TRÍBULO, R.; TRÍBULO, H.; MAPLETOFT, R. J. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 1, p. 53-72, 2002.

BO, G. A.; HOCKLEY, D. K.; NASSER, L. F.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of a porcine pituitary extract in beef cattle. **Theriogenology**, New York, v. 42, n. 6, p. 963-975, 1994b.

BO, G. A.; PIERSON, R. A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of estradiol valerate on follicular dynamics and superovulatory response in cows with Syncro-Mate-B implants. **Theriogenology**, New York, v. 36, n. 2, p. 169-183, 1991.

BUNGARTS, L.; NIEMAN, H. Assessment of the presence of a dominant follicle and selection of dairy cows suitable for superovulation by a single ultrasound examination. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 583-591, 1994.

BURATINI, JR., J.; PRICE, C. A.; VISINTIN, J. A.; BÓ, G. A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotropin (bst) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, New York, v. 54, n. 3, p. 421-431, 2000.

CACCIA, M.; BO, G. A. Follicle wave emergence following treatment of CIDR-B implanted beef heifers with estradiol benzoate and progesterone. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 1, p. 341, 1998.

CACCIA, M.; TRIBULO, R.; TRIBULO, H. Superovulatory response of beef cows treated with progesterone devices and estradiol-17 β or estradiol benzoate. **Theriogenology**, New York, v. 57, n. 1, p. 762, 2002.

CALLESEN, H.; GREVE, T.; HYTELL, P. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. **Theriogenology**, New York, v. 25, n. 1, p. 71-86, 1986.

CARVALHO, J. B. P.; REIS, E. L.; CARVALHO, N. A.; NICHI, M.; BARUSELLI, P. S. Follicular wave and luteal function in *Bos Taurus*, *Bos indicus* and *Bos Taurus x BosIndicus* heifers treated with progesterone device. In: INTERNATIONAL CONGRESSO ON ANIMAL REPRODUCTION-ICAR, 1., 2004, Porto Seguro. **Proceedings...** Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 2004, p. 112.

CHAGAS, J. S.; COSTA, L. L.; SILVA, J. R. Embryo yield and plasma progesterone profiles in superovulated dairy cows and heifers. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 69, n. 1, p. 1-8, 2002.

CHUPIN, D.; COMBARNOUS, Y.; PROCOREUR, R. Different effect of LH and FSH-induced superovulation in two breeds of cattle. **Theriogenology**, New York, v. 23, n. 1, p. 184, 1985.

CONFEDERAÇÃO DA AGRICULTURA E PECUÁRIA DO BRASIL. Brasil mantém exportação de carne. Brasília: CNA; 2005. Disponível em: <<http://www.cna.org.br>>. Acesso em: 21 nov. 2005.

DIELEMAN, S. S. D.; BEVERS, M. M. Folliculogenesis and oocyte maturation in superovulated cattle. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 36, n. 2, p. 271-273, 1993.

ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D.; SEIDEL, G. E. Superovulating cows with a follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. **Theriogenology**, New York, v. 9, n. 1, p. 17-26, 1978.

FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. The future of agriculture depends on biodiversity. FAO, 2004. Disponível em <www.fao.org/lwaicentlindexen.asp>. Acesso em: 17 jan. 2005.

FIGUEIREDO, R. A.; BARROS, C. M.; PINHEIRO, O. L.; SOLER, J. M. P. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 8, p. 1489-1505, 1997.

FORTUNE, J. E. Follicular dynamics during the bovine estrus cycle: A limiting factor in improvement of fertility. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 33, n. 1-4, p.111-125, 1993.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M. Persistent dominant follicles in cattle: Basic and applied aspects. **Arquivos da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, Porto Alegre, v. 7, n.1, p. 24-36, 1999.

FORTUNE, J. E.; RIVERA, G. M.; YANG, M. Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in the selection of the dominant follicle. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 82-83, p. 109-126, 2004. (Research and Practice III).

GAMBINI, A. L. G.; MOREIRA, M. B. P.; CASTILHO, C.; BARROS, C. M. Desenvolvimento folicular e sincronização da ovulação em vacas da raça Gir. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 22, n. 4, p. 201-210, 1998.

GARCIA, G. J. K.; SEIDEL, G. E.; ELSDEN, R. P. Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. **Theriogenology**, New York, v. 17, n. 1, p. 90, 1982.

GARVERICK, H. A.; ZOLLERS, W. G.; SMITH, M. F. Mechanisms associated with corpus luteum lifespan in animals having normal or subnormal luteal function. **Animal of Reproduction Science**, Amsterdam, v. 28, n. 1 - 4, p. 111-124, 1992.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrous cycle. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 20, n. 3, p. 187-200, 1989a.

GINTHER, O. J.; KASTELIC, J. P.; KNOPF, L. Intraovarian relationships among dominant and subordinate follicles and the corpus luteum in heifers. **Theriogenology**, New York, v.32, n. 5, p. 787-795, 1989b.

GONG, J. G.; BRAMLEY, T. A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 45, n. 6, p. 941-949, 1991.

GONZALES, A.; LUSSIER, J. G.; CARRUTHERS, T. D.; MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation of beef heifers with Folltropin-V: a new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, New York, v. 33, n. 2, p. 519-529, 1990.

GOTO, K.; OHKOT, S. U. S.; NAKANISHI, Y.; OGAWA, K.; TASAKI, M.; INOHAE, S.; TATEYAMA, S.; KAWABATA, T.; ISHI, I.; MIYAMOTO, A.; FURUSAWA, T.; UMEZU, M.; MASAKI, J. Endocrine profiles and embryo quality in superovulated Japanese Black Cattle. **Theriogenology**, New York, v. 29, n. 3, p. 615-629, 1988.

GRASSO, F.; GUILBAULT, L. A.; ROY, G. L.; LUSSIER, J. G. Ultrasonographic determination of ovarian follicular development in superovulated heifers pretreated with FSH-P at the beginning of the estrous cycle. **Theriogenology**, New York, v. 31, n. 6, p. 1209-1219, 1989.

GREVE, T.; CALLESEN, H.; HYTTEL, P.; HØIER, R.; ASSEY, R. The effects of exogenous gonadotropins on oocyte and embryo quality in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 43, n.1, p. 41-50, 1995.

GUILBAULT, L. A.; GRASSO, F.; LUSSIER, J. G.; ROUILLER, P.; MATTON, P. Decreased superovulatory response in heifers superovulated in the presence of a dominant follicle. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 32, n. 1, p. 81-99, 1991.

HASLER, J. F.; McCAULEY, A. D.; SCHERMERHOM, E. C.; FOOTE, R. H. Superovulatory responses of Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v. 19, n. 1, p. 83-99, 1983.

IRELAND, J. J.; ROCHE, J. F. Effects of progesterone on basal LH and FSH secretion in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 64, n. 2, p. 295-302, 1982.

KHORAM, H.; BOUSQUET, D.; DUROCHER, J.; GUILBAULT, L. A. Follicular status and superovulation in cattle: a field trial. **Theriogenology**, New York, v. 43, n. 1, p. 252, 1995.

LAND, R. B.; HILL, W. G. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. **Animal Production**, Edinburg, v. 21, p. 1-12, 1975.

LEMON, M. The effect of oestrogens alone or in association with progestagens on the formation and regression of the corpus luteum of the cyclic cow. **Annual Biology Animal Biochemistry Biophysics**, v. 15, p. 243-253, 1975.

LERNER, S. P.; THAYNE, W. G.; BAKER, R. D.; HENSCHKE, T.; MEREDITH, S.; INSKEEP, E. K.; DAILEY, R. A.; LEWIS, P. E.; BUTCHER, R. L. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 63, n.1, p. 176-183, 1986.

LINDNER, G. M.; WRIGHT JR, R. W. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, New York, v. 20, n. 4, p. 407-416, 1983.

LINDSELL, C. E.; MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of the estrous cycle. **Theriogenology**, New York, v. 26, n. 2, p. 209-219, 1986.

LOONEY, C. R. Superovulation in beef females. In: **ANNUAL CONVENTION OF THE AMERICAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION**, 5., 1986, Forth Worth. Proceedings... Forth Worth AETA, 1986, n. 1, p. 16-29.

MACMILLAN, K. L.; BURKE, C. R. Effects of oestrous cycle control on reproductive efficiency. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 42, n. 1-2, p. 307-320, 1996.

MACMILLAN, K. L.; TAUFA, V. K.; BARNES, D. R.; DAY, A. M. Plasma progesterone concentrations in heifers and cows treated with a new intravaginal device. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 26, n. 1-2, p. 25-40, 1991.

MAPLETOFT, R. J.; PIERSON, R. A. Factors affecting superovulation in the cow: practical considerations. **International Embryo Transfer Society**, Embryo Transfer Newsletter, New York, v. 11, n. 1, p. 14-24, 1993.

MAPLETOFT, R. J.; PIERSON, R. A. Recruitment of follicles for superovulation. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 16, p. 127-141, 1994.

MEYER, J. A.; WIDEMAN, JR., D.; LOONEY, C. R.; LONG, C. R.; BO, G. A.; DAY, M. L.; ANDERSON, J. C.; FORREST, D. W. Embryo production rates of cattle superovulated with and without the presence of an intravaginal progesterone-releasing device. **Theriogenology**, New York, v. 53, n. 1, p. 504, 2000.

MOMONT, H. W.; SEGUIN, B. E. Treatment of unobserved estrus in lactating dairy cows with prostaglandin F_{2α} products. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, p. 28-31, 1984. (Special Edition).

MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, New York, v. 19, n. 1, p. 55-82, 1983.

MURPHY, B. D.; MAPLETOFT, R. J.; MANNS, J.; HUMPHREY, W. D. Variability in gonadotrophin preparations as a factor in the superovulatory response. **Theriogenology**, New York, v. 21, n. 1, p. 117-125, 1984.

- NASSER, L. F.; ADAMS, G. P.; BO, G. A.; MAPLETOFT, R. J. Ovarian superstimulatory response relative to follicular wave emergence in heifers. **Theriogenology**, New York, v. 40, n. 4, p. 713-724, 1993.
- ORTUÑO, A. M.; CARSON, R. L. The effects of dietary monesin sodium upon superovulation and embryo viability from mature cows. **Theriogenology**, New York, v. 23, n. 5, p. 743-752, 1985.
- PAWLYSHYN, V.; LINDSELL, C. E.; BRAITHWAITE, M.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation of beef cows with FSH-P: a dose response trial. **Theriogenology**, New York, v. 25, n. 1, p.179, 1986.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Follicular populations during the estrous cycle in heifers: III. Time of selection of the ovulatory follicle. **Journal of Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 16, n. 2, p. 81-95, 1988.
- PIERSON, R. A.; GINTHER, O. J. Ultrasonograph of the bovine ovary. **Theriogenology**, New York, v. 21, n. 3, p. 495-504, 1984.
- PINHEIRO, O. L.; BARROS, C. M.; FIGUEIREDO, R. A.; VALLE, E. R.; PADOVANI, C. R. Estrous behavior and the estrus-to-ovulation interval in Nelore cattle (*Bos indicus*) with natural estrus or estrus induced with prostaglandin F₂ or norgestomet and estradiol valerate. **Theriogenology**, New York, v. 49, n. 3, p. 667-681, 1998.
- RAJAKOSKI, E. The ovarian follicular system in sexually mature heifers with special reference to seasonal, cyclical and left-right variations. **Acta Endocrinology**, v. 34, p. 7-68, 1960. (Supplementum 52).
- RAJAMAHENDRAN, R.; CANSECO, R. S.; DENBOW, C. J.; GWAZDAUSKAS, F. C.; VINSON, W. E. Effect of low dose of FSH given at the beginning of the estrous cycle and subsequent superovulatory response in Holstein cows. **Theriogenology**, New York, v. 28, n. 1, p. 59-65, 1987.
- RAJAMAHENDRAN, R.; MANIKKAN, M. Effects of exogenous steroid hormones on the dominant follicle maintained by a norgestomet implant in heifers. **Canadian Journal of Animal Science**, Ottawa, v. 74, n. 4, p. 457-464, 1994.
- RANDEL, R. D. LH and ovulation in Brahman, Brahman X Hereford and Hereford heifers. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 43, n. 1-2, p. 300, 1989.
- REVAH, I.; BUTLER, W. R. Prolonged dominance of follicles and reduced viability of bovine oocytes. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 106, n. 1, p. 39-47, 1996.

RIEGER, D.; DESAULINIER, D.; GOFF, A. K. Ovulatory response and embryo yield in superovulated Holstein heifers given a priming dose of FSH-P at day 2 of the estrous cycle. **Theriogenology**, New York, v. 30, n. 4, p. 695-699, 1988.

ROMERO, A.; ALBERT, J.; BRINK, Z.; SEIDEL, G. E. Numbers of small follicles in ovaries affect superovulation response in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 1, p. 265, 1991.

SAVAGE, N. C.; HOWELL, W.; MAPLETOFT, R. J. Superovulation in the cow using 17 β or GnRH in conjunction with FSH-P. **Theriogenology**, New York, v. 27, n. 3, p. 383-394, 1987.

SAVIO, J. D.; KEENAN, L.; BOLAND, M. P.; ROCHE, R. F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrus cycle in heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 83, n. 2, p. 111-119, 1988.

SEGERSON, E. C.; HANSEN, T. R.; LIBBY, D. W.; RANDEL, R. D.; GETZ, W. R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 59, n. 4, p. 1026-1046, 1984.

SIMPSON, R. B.; CHASE JR., C. C.; SPICER, L. J.; VERNON, R. K.; HAMMOND, A. C.; RAE, D. O. Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular oestradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 102, n. 2, p. 483-492, 1994.

SIROIS, J.; FORTUNE, J. E. Ovarian follicular dynamics during the estrous cycle in heifers monitored by real-time ultrasonograph. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 39, n. 2, p. 308-317, 1988.

SPICER, L. J.; ALPIZAR, E.; ECHETERNKAMP, S. E. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production in vitro. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 71, n. 5, p. 1232-1241, 1993.

SUNDERLAND, S. J.; CROWE, M. A.; BOLAND, M. P.; ROCHE, J. F.; IRELAND, J. J. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrus cycle of heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 101, n. 3, p. 547-555, 1994.

THATCHER, W. W.; GUZELOGLU, A.; MATTOS, R. C.; BINELLI, M.; HANSEN, T. R.; PRU, J. K. Uterine-conceptus interactions and reproductive failure in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 56, n. 9, p. 1435-1450, 2001.

THIBIER, M. The animal embryo transfer industry in figures: Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world. A report from the International Embryo Transfer Society data retrieval committee. **International Embryo Transfer Newsletter**, New York, n. 1, p. 12-19, 2004.

TOUATI, K.; BECKERS, J. F.; ECTORS, F. J.; ECTORS, F. Hormonal control of folliculogenesis in the bovine: better superovulatory responses after pure FSH administration preceding the classical treatment. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 1, p. 285, 1991.

TRIBULO, H.; BO, G. A.; JOFRE, F.; CARCEDO, J.; ALONSO, A.; MAPLETOFT, R. J. The effect of LH concentration in a porcine pituitary extract and season on superovulatory response of *Bos indicus* heifers. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 1, p. 286, 1991.

VACA, L. A.; GALINA, C. S.; FERNANDEZ-BACA, S.; ESCOBAR, F. J.; RAMÍREZ, B. Oestrous cycles, oestrus and ovulation of the Zebu in the Mexican tropics. **The Veterinary Record**, London, v. 117, n. 26, p. 434-437, 1985.

VAN DE LEEMPUT, E. E.; VOS, P. L. A. M.; HYTTEL, P.; HURK, R.; BEVERS, M. M.; VAN DER WEIJDEN, G. C.; DIELEMAN, S. J. Effects of brief postponement of the preovulatory LH surge on ovulation rates and embryo formation in eCG/Prostaglandin treated heifers. **Theriogenology**, New York, v. 55, n. 2, p. 573-592, 2001.

VAN DER SCHANS, A.; VAN DER WESTERLAKEN, L. A. J.; DE WIT, A. A. C.; EYESTONE, W. H.; DE BOER, H. A. Ultrasound-guided transvaginal collection of oocytes in the cow. **Theriogenology**, New York, v. 35, n. 1, p. 288, 1991.

VOS, P. L. A. M.; VAN DE LEEMPUT, E. E.; ZEINSTRA, E. C.; BEVERS, M. M.; DIELEMAN, S. J. Post ponent of the preovulatory LH surge does not impair the developmental potential of in vivo matured oocytes from eCG/PG superovulated heifers. **Theriogenology**, New York, v. 45, n. 1, p. 329, 1996.

WANG, H.; WU, M.; XU, K.; HAGELE, W. C.; MAPLETOFT, R. J. Control of superovulation in the cow with a PMSG antiserum. **Theriogenology**, New York, v. 27, n. 1, p. 291, 1987.

WEHRMAN, M. E.; FIKE, K. E.; MELVIN, E. J.; KOJIMA, F. N.; KINDER, J. E. Development of a persistent ovarian follicle and associated elevated concentrations of 17 β -estradiol preceding ovulation does not alter the pregnancy rate after embryo transfer in cattle. **Theriogenology**, New York, v. 47, n. 7, p. 1413-1421, 1997.

WILTBANK, J. N.; STURGES, J. C.; WIDEMAN, D.; LEFEVER, D. G.; FAULKNER, L. C. Control of oestrus and ovulation using subcutaneous implant and oestrogen in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 33, n. 3, p. 600-606, 1971.

WILTBANK, M. C.; KASSON, C. W. Synchronization of oestrus in cattle with an oral progestacional agent and an oestrogen. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 27, n. 1, p. 113-116, 1968.